



TITLE:

プロムモザイクウイルスの外被蛋白質翻訳に関する研究(  
Dissertation\_全文)

AUTHOR(S):

三瀬, 和之

---

CITATION:

三瀬, 和之. プロムモザイクウイルスの外被蛋白質翻訳に関する研究. 京都大学, 1991, 農学博士

ISSUE DATE:

1991-03-23

URL:

<https://doi.org/10.11501/3053119>

RIGHT:

新 制

農

600

京大附図

プロムモザイクウイルスの  
外被蛋白質翻訳に関する研究

三 瀬 和 之

1 9 9 1

ブロムモザイクウイルスの  
外被蛋白質翻訳に関する研究

三瀬和之

1991

## 目 次

	頁数
第I章. 序 論	1
第II章. プロモモザイクウイルス(BMV)の外被蛋白質の多様性	4
材料と方法	5
結 果	
1. 植物RNAウイルスの外被蛋白質	9
2. BMV粒子に含まれるRNAの分析	9
考 察	10
第III章. BMV RNAの試験管内合成系の確立	15
材料と方法	16
結 果	
1. BMV RNAの末端塩基配列の決定	34
2. BMV RNAに対する全長cDNAの作製	35
3. 転写ベクター(pUCT)の作製および全長cDNAの転写ベクター への挿入	41
4. BMVゲノムRNAの全長cDNAの転写および転写物の特性	42
考 察	43
第IV章. BMV ATCC66系統のゲノムRNAの塩基配列の決定とBMV Russian 系統との比較	60
材料と方法	61
結 果	
1. BMV ATCC66系統のゲノムRNAの塩基配列の決定	62
2. BMVのATCC66系統とRussian系統におけるゲノムRNAの塩基配列 とアミノ酸配列の比較	63
考 察	66



第V章. BMV ATCC66系統の外被蛋白質翻訳機構の解析	88
材料と方法	88
結 果	
1. 変異RNA3の作製とin vivoにおける外被蛋白質翻訳の解析	93
2. 変異RNA4の作製とin vitroにおける外被蛋白質翻訳の解析	95
3. BMV RNA4の5'端領域の塩基配列と外被蛋白質の翻訳	99
考 察	100
第VI章. 総合考察	120
摘 要	124
引用文献	127

## 第I章. 序 論

ウイルスは、19世紀の終わりにタバコにモザイク症状をひき起こす、ろ過性病原体として初めて発見された。その後、Stanleyによるタバコモザイクウイルス (TMV)の結晶化<sup>15)</sup>、Fraenkel-ConratらによるTMV-RNAの感染性の証明<sup>35)</sup>など、植物RNAウイルスなかでもTMVが生化学、分子生物学などの分野において果たしてきた役割は非常に大きい。しかし、1970年代に入りDNAの組換え技術が確立されると、分子生物学はいわゆるDNA学が主流となった。この間にDNAの簡便な塩基配列決定法やクローニング技術が開発されてきた。一方、1970年に動物RNAウイルスであるトリ骨髄肉腫ウイルスが自己複製に逆転写酵素を用いていることが明らかにされて以来<sup>120)</sup>、この酵素を利用してRNAウイルスの遺伝子もDNAとして扱えるようになった。その結果、1984年にブロムモザイクウイルス (Brome mosaic virus, BMV)において、宿主植物に感染性を示すウイルスRNAを試験管内で合成できる系が、RNAウイルスで初めて確立された。

BMVはプロモウイルス群に属し、主にイネ科植物を宿主とするRNAウイルスである<sup>73)</sup>。BMVのゲノムは、3種のプラスセンスすなわちmRNA活性を持つ一本鎖RNAからなり、分子量の大きい方から順にRNA1、RNA2およびRNA3と呼ばれている。ウイルス粒子中にはさらにサブゲノムRNAとしてRNA4も存在している。なお、RNA4は外被蛋白質の情報を持っている<sup>23)</sup>が感染性には関与せず、増殖過程においてRNA3のマイナス鎖から合成される<sup>83)</sup>。BMVはこれら4種の1本鎖RNAが直径約26nmの3種の粒子に配分された多分節ゲノム構造をとっている<sup>72)</sup>。BMVはその増殖量がTMVと同程度に多いことから生化学的研究や遺伝子情報の解析などに、古くからよい実験材料として用いられてきた。

- 1984年、Ahlgquistらのグループによって、BMVのRussian系統においてゲノムRNAの全塩基配列が明らかにされた<sup>3, 4)</sup>。その結果、RNA1、RNA2はそれぞれ1a蛋白質、2a蛋白質と呼ばれる109キロダルトン(Kd)、94Kdの蛋白質をコードしていることがわかった。RNA3は3a蛋白質と呼ばれる32Kdの蛋白質と分子量20Kdの外被蛋白質をコードしているが、RNA3から直接翻訳されるのは5'端側の3a蛋白質のみで

あり、外被蛋白質はサブゲノムRNAであるRNA4から翻訳される。BMVはRNA1およびRNA2だけで宿主細胞中でRNA複製が可能なことから<sup>37,63)</sup>、1aおよび2a蛋白質はRNA複製酵素のサブユニットではないかと考えられてきた。最近抗体を用いた実験から、少なくとも1a蛋白質はRNA複製酵素のサブユニットであることが示唆された<sup>54,98)</sup>。また、3a蛋白質はTMVの細胞間移行に関与する30Kd蛋白質<sup>28,88)</sup>と分子量あるいはゲノムにおけるコーディング領域の位置に関して共通点が多いこと、また、3a蛋白質遺伝子の欠損変異体ウイルスが全身に感染する能力を失う<sup>38)</sup>ことから、3a蛋白質はBMVの細胞間移行に関与していることが示唆されている。外被蛋白質については、ウイルス粒子を構成する構造蛋白質であり、ゲノムRNAを保護する機能のほか、RNA複製の制御にも関与していることが示唆されている<sup>52,53)</sup>。

BMVではすでにウイルス感染オオムギ葉からRNA複製酵素が抽出され、その酵素を用いてBMVの*in vitro* RNA合成系が確立されている<sup>74,82,98)</sup>。BMV遺伝子の構造と機能の解析への組換えDNA技術の導入は、まずこの系を用いてなされた。すなわち、BMVのcDNAから転写ベクターを用いて鋳型活性のあるRNA断片を調製し、RNA複製酵素との相互作用をみることによって、BMV RNAのマイナス鎖合成に関与する領域<sup>5,19,21,32,33,84)</sup>およびRNA3のマイナス鎖中のサブゲノムRNA合成に関与する領域<sup>75,83)</sup>の同定が行われた。

一方、*in vitro*でBMV RNAを合成する系が確立された後は、プロトプラスト系を用いRNAの複製にcisあるいはtransに働く因子の解析がなされてきた<sup>11,38,39)</sup>。Ahlgvistらのグループは、さらにBMVと同じプロモウイルス群に属する cowpea chlorotic mottle virus(CCMV)においても同様の系を確立した後、両ウイルスのゲノムRNA間で種々の組換え体を作製し、宿主特異性に関わる因子についても解析した<sup>8,11)</sup>。このような生物活性を持つcDNAは植物ウイルスのRNA複製機構に関する基礎研究ではもちろんのこと、応用面でも有用物質生産のためのウイルスベクターの構築<sup>37,118)</sup>やウイルス病防除<sup>15,116)</sup>の研究など様々な分野での利用の可能性が指摘されている。

本研究室では、1973年からBMV ATCC66系統を用いて、ウイルスRNAの合成や複製酵素に関する研究を行ってきた<sup>85)</sup>が、その過程でBMV粒子を構成する外被蛋白質

が2種類の蛋白質からなっていることが明らかとなった。本研究ではこの現象を分子レベルで解析することを目的とし、まず完全長cDNAを用いたBMV RNAの試験管内合成系を確立した。またその系のもつ重要性についても論議した。さらに、塩基配列およびアミノ酸配列をRussian系統と比較した後、BMV ATCC66系統の外被蛋白質の発現機構を分子レベルで詳細に解析した。

本論文を草するにあたり、終始懇切なる指導を賜り有益な助言と批判により本研究の遂行を鼓舞された、京都大学農学部植物病理学研究室古澤 巖教授に衷心より感謝の意を表するとともに、本論文校閲の労をとられた同学部遺伝学研究室常脇恒一郎教授と同学部生物化学研究室駒野 徹教授に深く感謝の意を表する。また本実験を行うにあたり多くの助言と援助を頂いた同学部助教授奥野哲郎博士、京都府立大学農学部助教授田中国介博士および日本農薬株式会社堀越 守博士に厚く感謝の意を表する。さらに、研究を遂行するにあたり絶大なる協力を頂いた大学院博士課程の森 正之氏、実験中終始温かい支援を惜しまれなかった、同課程の小林括平氏をはじめ植物病理学研究室の学生諸氏に対し、厚く御礼を申し上げます。

## 第II章. ブロムモザイクウイルス(BMV)の外被蛋白質の多様性

現在知られている植物ウイルスは600種以上あり、そのゲノムを構成している核酸の種類によってRNAウイルスとDNAウイルスに分けられ、また、それぞれに一本鎖あるいは二本鎖をゲノムとするものがある<sup>129)</sup>。一本鎖RNAをゲノムとするウイルスはさらに、ゲノムRNAが直接宿主細胞のリボゾーム上で蛋白質合成を行う、いわゆるプラス鎖RNAウイルスと、粒子内のRNAポリメラーゼによって、まずゲノムRNAに相補的なプラス鎖RNAを合成した後、蛋白質合成を行うマイナス鎖RNAウイルスに分けられる。マイナス鎖RNAウイルスにはウイルス粒子の外側を外膜と呼ばれる宿主細胞由来の膜成分によって包まれているものがある。しかし、大部分の植物ウイルス、とくに全植物ウイルスの4分の3以上を占めるプラス鎖RNAウイルスにおいては<sup>129)</sup>、その全てがRNAとそれを包む外被蛋白質のみからなっている。

植物ウイルスはまた粒子の形態によって棒状、ひも状ウイルスと球状ウイルスとに分けられる。棒状、ひも状ウイルスはプラス鎖RNAウイルスのみにみられるもので、蛋白質サブユニットがらせん対称に配列する構造をとるため、粒子は1種類のポリペプチドのみから構成されている。球状ウイルスでもプラス鎖RNAをゲノムにもつものは、コモウイルスグループに属するササゲモザイクウイルス<sup>36)</sup>など複数のポリペプチドを含むごく一部のウイルスを除けば、大部分のウイルスが、1種類のポリペプチドから構成されている。

BMVは、プラス鎖RNAをもつ球状ウイルスで、粒子の外被蛋白質は、分子量20,000の1種類のポリペプチドから構成されていると報告されてきた<sup>73)</sup>。京都大学農学部植物病理学研究室では、1973年からBMVとしてATCC66系統を用いてきた。本章では、ATCC66系統のウイルス粒子を構成する外被蛋白質に焦点を絞り、BMVの他の3系統および他のプラス鎖RNAウイルスの外被蛋白質と比較した。その結果、唯一BMV ATCC66系統でのみ2種類のポリペプチドが検出され、また分子量においても系統間で多様性がみられた。本章では、このようなBMVの外被蛋白質の多様性の機構を分子レベルで解析する前に、まずそのような多様性に関わる要因を概略的に探求することを試みた。

## 材料と方法

### 1. オオムギの育成<sup>9)</sup>

オオムギ (*Hordeum vulgare* L. cv. 五畝四石および cv. Moore) の種子を流水中で一晩催芽させた後、五畝四石はコンバル(住友林業社)、Mooreはパーミキュライトを約7cmの深さにいれたプラスチック製のかご(35×45×15cm)に1かご当り150粒程度(約15 ml)播種し、種子が隠れる程度に被覆した。20°C前後に制御されたガラス温室内で、1日1回、1g/lのハイポネックス水溶液を与え、自然光下で育成した。播種6日後の第1葉期のオオムギを、五畝四石はウイルスの感染性検定に、また、Mooreはプロトプラストを調製し、ウイルス特異的な蛋白質やRNAの検定に用いた。

### 2. ブロムモザイクウイルス(BMV)の由来

ブロムモザイクウイルス(BMV)は、ATCC66、ATCC PV47、ATCC PV178およびATCC PV180系統を用いた。ATCC66系統は、カナダ、アルバータ大学の比留木忠治博士から譲与された(1973年)ものを植物病理学研究室で約15年間オオムギで継代増殖し保存してきた。ATCC PV47, ATCC PV178およびATCC PV180系統は、米国のAmerican Type Culture Collectionから、ウイルス感染葉の凍結乾燥標品として得た(1990年)。標品調製の日付はPV47が1968年12月、PV178が1972年12月、PV180が1973年1月であった。

### 3. BMVの純化

ウイルス溶液は直接、凍結乾燥標品はABバッファー(50 mM 酢酸バッファー, pH 5.2, 2 mM MgCl<sub>2</sub>)中で磨砕し、それぞれカーボランダム(600メッシュ)を散布

したオオムギの第1葉に綿棒で塗布接種した。2週間後、モザイク症状の顕著に現われた葉を採取し、使用するまで $-70^{\circ}\text{C}$ で凍結保存した。感染葉200gに2 mM  $\text{MgCl}_2$ を含む0.5 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ を300 ml加え10分間ミキサーあるいは乳鉢で磨砕した後、4層のガーゼでろ過し、ろ液を室温に1時間放置した。そのろ液を遠心分離( $8,000\times g$ 、15分間)し、上清画分をさらに遠心分離( $105,000\times g$ 、90分間)し、沈渣として粗BMV画分を得た。遠心分離はいずれも室温で行った。粗BMV画分に少量のABバッファーを加え、 $8^{\circ}\text{C}$ に一晩放置し懸濁した後、 $4^{\circ}\text{C}$ で $8,000\times g$ 、15分間と $105,000\times g$ 、90分間の遠心分離を行った。この操作をさらに数回繰り返し、BMVを純化した。BMVの濃度は、 $A_{260}/A_{280}=5$ から計算した。最終的に得られた純化標品は10%モノエチレングリコールを含むABバッファーに10 mg/mlになるように懸濁し、 $-70^{\circ}\text{C}$ で凍結保存した。

#### 4. ウイルスRNAの純化

純化BMV標品(10 mg/ml)100  $\mu\text{l}$ に、100  $\mu\text{l}$ のRNA抽出バッファー(50 mM Tris-HCl, pH 7.6, 1 mM EDTA, 50 mM NaCl, 0.1%(w/v)ベントナイトおよび1%(w/v) SDS)と200  $\mu\text{l}$ のTE飽和フェノール(0.1%(w/v) 8-キノリノールを含むフェノールをTEバッファー(10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA)で飽和したもの)を加え、激しく振盪後、遠心分離( $12,000\times g$ 、3分間)し、水層を別のチューブに移した。200  $\mu\text{l}$ のTE飽和フェノールを加え、よく攪拌した後、遠心分離( $12,000\times g$ 、3分間)し、上清を別のチューブに移した(以下、この操作をフェノール抽出という)。200  $\mu\text{l}$ のフェノール/クロロホルム(熱融解したフェノール500 ml、クロロホルム480 ml、イソアミルアルコール20 ml、8-キノリノール1g および2-メルカプトエタノール2 mlの混合液を1 M Tris水溶液(pH未調整)で飽和したもの)を加え、充分に攪拌した後、遠心分離( $12,000\times g$ 、2分間)し、上清を別のチューブに移した(以下、この操作をフェノール/クロロホルム抽出という)。200  $\mu\text{l}$ のクロロホルム(クロロホルム:イソアミルアルコール=24:1の混合液)を加え、充分に攪拌した後、遠心分離( $12,000\times g$ 、1分間)し、上清を別のチューブに移した(以下、こ

の操作をクロロホルム抽出という)。500  $\mu$ lのジエチルエーテルを加え、充分攪拌した後、遠心分離(12,000 $\times$ g、数秒間)し、上層のエーテルを捨てることによって、水層に残った、フェノール、クロロホルムを除去した(以下、この操作をエーテル処理という)。このエーテル処理をさらに2回繰り返した。1/10容量の3 M 酢酸ナトリウム(pH 5.2)および2.5倍容量のエタノールを加え、よく混ぜた。-70°Cで15分間以上保った後、遠心分離(12,000 $\times$ g、10分間)し、上清を捨てた。1 mlの70%(v/v)エタノールを加え、沈澱がチューブの底からはがれるまで攪拌した後、遠心分離(12,000 $\times$ g、5分間)し、上清を捨てた。再び遠心分離(12,000 $\times$ g、1秒間)し、内壁に残っているエタノールを集めマイクロピペットで完全に除いた後、デシケーター中で5~20分間減圧乾燥した(エーテル処理以降の一連の操作を、以下単にエタノール沈澱という)。得られたRNAを500  $\mu$ g/mlになるようにDDW(0.1%(v/v)ジエチルピロカーボネート(DEPC)を含むイオン交換水を37°Cに一晩放置後、乾熱処理(250°C、4時間)したガラス容器に移し、オートクレーブ処理(121°C、60分間)したものに溶解して-70°Cで保存した。なお、RNAの濃度は、 $A_{260}/A_{280}=22$ から計算した。

## 5. アガロースゲル電気泳動

DNA、RNA の分子量あるいは制限酵素によるDNAの切断パターンを知るため、アガロース(ナカライテスク社、アガロースME)ゲル電気泳動を行った。ゲル濃度は、問題とする核酸の分子量によって0.7~2.0%(w/v)のものを用いた。泳動バッファは、DNAにはTAEバッファ(40 mM Tris-酢酸、1 mM EDTA)、RNAにはTBEバッファ(89 mM Tris-ホウ酸、1 mM EDTA)を用い、ミニゲル電気泳動装置(Mupid 2, アドバンス社)によって行った。サンプルに1/10容量の10 $\times$ ローディングバッファ(0.25%(w/v)プロモフェノールブルー、0.25%(w/v)キシレンシアノールFF、2%(w/v)ドデシル硫酸ナトリウム(以下 SDS)、1 mM EDTA、50%(v/v)グリセロール)を加えたものを、マイクロピペットでサンプル溝に注入した。100Vで30~40分間泳動した後、ゲルを0.5  $\mu$ g/mlのエチジウムブロミドを含む泳動バッファ中に10~



20分間浸漬した。染色を終えたゲルを取り出し、UVランプまたはトランスイルミネーター(長波長)を用いて暗所で観察または写真撮影した。

## 6. SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)

ウイルス蛋白質を分析するために、Laemmliの方法<sup>71)</sup>および成書<sup>113)</sup>に従ってSDS-PAGEを行った。外被蛋白質のみを分析する場合は15%ゲルを、全ウイルス蛋白質を分析する場合は12.5%ゲルを用いた。

## 7. ウェスタンブロッティング法

試料中の蛋白質抗原の検出は、抗体を用いたウェスタンブロッティング法によって行った。

### 1) 抗体の調製

1a蛋白質、2a蛋白質およびBMV粒子に対する抗血清(それぞれ以下、抗1a、抗2aおよび抗BMV血清)は、植物病理学研究室保存のものを用いた。3a蛋白質に対する抗血清の調製には、抗1a、抗2a血清と同様に大腸菌の発現ベクターであるpRIT2I(Pharmacia社)を利用した。すなわち、BMV RNA3の全長cDNAを含むpBTF3(図6)からHaeIII(塩基番号505、以下N505と表示する)/Sal I (N1250)断片を切り出し、pRIT2IのSma I /Sal I 部位に挿入し、pEBRIIIを得た。このHaeIII/Sal I 断片は、3a蛋白質のC端半分の遺伝子領域を含む。大腸菌におけるpEBRIIIからの融合蛋白質の発現、純化および得られた融合蛋白質を用いた抗血清(抗3a血清)の調製はHorikoshiらの方法<sup>54)</sup>に従った。

### 2) 蛋白質のメンブレンへの転写および抗原の検出

SDS-PAGE後の蛋白質のメンブレンへの転写は成書<sup>113)</sup>に従って行った。蛋白質

を転写する膜にはナイロンメンブレン(PVDF、Millipore社)を用い、ブロッキング試薬としてスキムミルク(Difco社)を用いた。一次抗体溶液としては抗血清を抗体溶液(20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 0.5 M NaCl, 1%(w/v)ゼラチン(EIAグレード、Bio-Rad社), 0.05%(v/v)Tween20)で400倍に希釈したものを用い、二次抗体溶液としてはアルカリホスファターゼ結合ヤギ抗ウサギIgG(Bio-Rad社)を抗体溶液で3,000倍に希釈したものを用いた。発色液として0.33 mg/mlのニトロブルーテトラゾリウムを含む12 mlのAP<sub>s.s</sub>溶液(100 mM Tris-HCl, pH 9.5, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O)に50 mg/mlの5-ブromo-4-クロロ-3-インドリル リン酸-p-トルイジン塩を含む40 µlのN,N'-ジメチルホルムアミドを加えたものを用いた。

## 結 果

### 1. 植物RNAウイルスの外被蛋白質の分析

BMV4種(ATCC66系統、ATCC PV47系統、ATCC PV178系統およびATCC PV180系統)、タバコモザイクウイルス(以下、TMV)1種(OM系統)およびキュウリモザイクウイルス(以下、CMV)1種(Y系統)の粒子を構成する外被蛋白質をSDS-PAGEによって分析した(図1)。その結果、BMV ATCC66系統を除く他の5種のウイルスの外被蛋白質は、単一のバンドとして泳動されたが、BMV ATCC66系統は、2種のバンドとして泳動された。また、分子量マーカーとの比較から求めたBMVの外被蛋白質の分子量はPV47系統、PV178系統およびPV180系統では21.5キログルトン(Kd)であり、ATCC66系統では、22.4Kdと21.2Kdの2種類であった。BMV感染オオムギ葉における外被蛋白質をBMV ATCC66系統に対する抗体を用いてウエスタンブロッティング法によって検出した結果、粒子を構成する外被蛋白質のSDS-PAGEの泳動パターンと全く同一の結果を得た(図2)。

### 2. BMV粒子に含まれるRNAの分析

BMV 4系統の粒子に含まれるRNAを抽出し、TBE-アガロースゲル電気泳動によって分析した(図3)。その結果、ATCC PV47系統、ATCC PV178系統およびATCC PV180系統では粒子に含まれる4種のウイルスRNAの量比がほぼ等しかった。それに対して、ATCC66系統では、RNA3あるいはRNA4に対してRNA2の量比が低く、さらにRNA1はRNA2よりも少量しか検出されなかった。しかし、外被蛋白質が2種類検出されたATCC66系統においても、外被蛋白質のmRNAであるRNA4が2種類存在するということではなかった。

## 考 察

本実験で用いたウイルスの中でBMV-ATCC66系統のみに2種類の外被蛋白質が認められた。さらに、BMVの他の系統の外被蛋白質は、分子量的にATCC66系統でみられた2種類の蛋白質の間の値を示した。一方、ATCC66系統の粒子に対して調製した抗血清を用いた血清学的分析により、ATCC66系統の外被蛋白質は他の3系統のものと同一抗原性を持っており、少なくとも一部のアミノ酸配列は血清学的に同様であることが示唆された。しかし、ATCC66系統でみられた2種の外被蛋白質は、いずれも他のBMV3系統の外被蛋白質とSDS-PAGEにおける移動度が異なったことから、2種の外被蛋白質はともに他の系統の外被蛋白質とはアミノ酸組成あるいはアミノ酸配列が、同一ではないことが示唆された。

ATCC66系統のみが2種の外被蛋白質をもつ要因として、①外被蛋白質のmRNAであるサブゲノムRNA4を2種類合成して、それぞれから外被蛋白質が翻訳される、②1種類のサブゲノムRNAを合成し、TMVの130Kと180K蛋白質のようにread throughによって2種類のペプチドが翻訳される<sup>10)</sup>、③1種類のサブゲノムRNAを合成し、動物ウイルスであるSV40のように異なる2ヶ所の開始コドンから翻訳が開始され同じ終止コドンで終わる<sup>9)</sup>、④1種類のサブゲノムRNAを合成し、1種類の外被蛋白質が翻訳された後、Cowpea mosaic virusのように蛋白質がプロセッシングをうける

36) ことなどが考えられた。これらの可能性の前にウイルス粒子の抽出過程で一部の外被蛋白質が分解を受けることも考えられた。しかし、BMV感染葉のウェスタンブロット分析によって、ATCC66系統では感染葉中にも2種類の外被蛋白質が認められたことからその可能性は否定された。①の可能性を調べるためにウイルス粒子に含まれるRNAを調べた結果、ATCC66系統においても2種類のサブゲノムRNAは認められなかった。しかし、従来の方法では、ここまでしか調べることができない。以下の章では、遺伝子操作法を利用した解析法を導入し、上述の可能性を詳細に調べた。

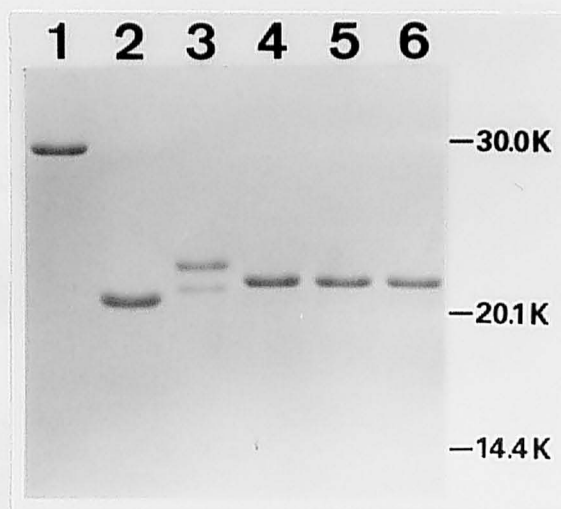


図 1. 植物RNAウイルスの外被蛋白質のSDS-15% PAGE分析

1. キュウリモザイクウイルス(Y系統)、2. タバコモザイクウイルス(OM系統)、3. ブロムモザイクウイルス(BMV、ATCC66系統)、4. BMV(ATCC PV47系統)、5. BMV(ATCC PV178系統)、6. BMV(ATCC PV180系統). 各ウイルスともに1レーンに $5\mu\text{g}$ のウイルス粒子をロードした。分子量マーカーは、30.0K(ウシ赤血球カルボニックアンヒドラーゼ)、20.1K(ダイズトリプシンインヒビター)、14.4K(卵白リゾチーム)を用いた。

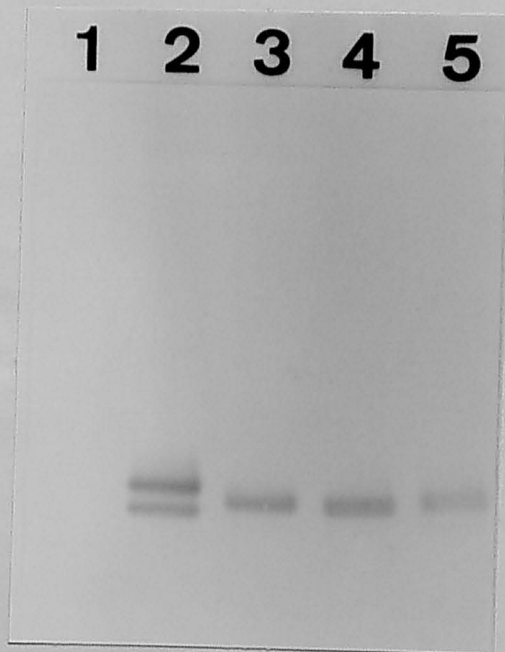


図 2. BMV感染オオムギ葉中の外被蛋白質のウエスタンブロッティング法による分析

1. 非感染葉、2. BMV(ATCC66系統)、3. BMV(ATCC PV47系統)、  
4. BMV(ATCC PV178系統)、5. BMV(ATCC PV180系統)

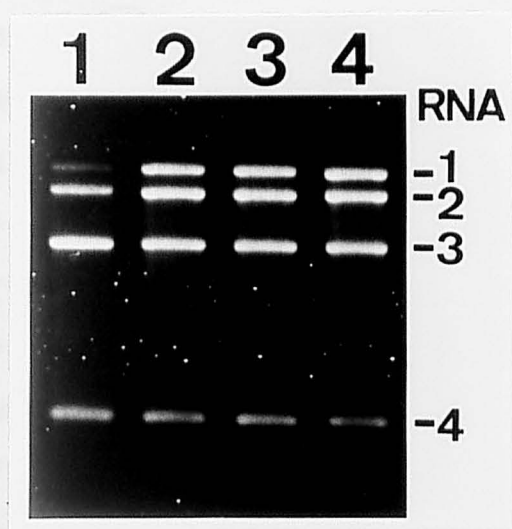


図3. BMV粒子中のRNAのアガロースゲル電気泳動による分析  
 1. BMV(ATCC66系統)、2. BMV(ATCC PV47系統)、3. BMV(ATCC PV178系統)、4. BMV(ATCC PV180系統)

### 第III章. BMVの試験管内RNA合成系の確立

最近の遺伝子工学の進歩は、植物ウイルスの研究分野においても画期的な変革を生み出した。すなわち、逆転写酵素の発見<sup>120)</sup>およびDNAクローニング技術の発展<sup>75)</sup>によってRNAウイルスのゲノムRNAに対して相補的なDNA(cDNA)の合成とクローニングが容易に行えるようになった。その結果、まずTMVにおいてcDNAの塩基配列を決定することにより全ゲノムRNAの塩基配列が決定された<sup>49)</sup>のを初めとして、現在に至るまで多くの植物RNAウイルスでそれらのゲノム構造が明きらかにされつつある。さらに、cDNAから野性型と同様の感染性および生物活性のあるウイルスRNAを試験管内で人工的に作り出すことができるようになった。その原理は、ウイルスRNAのcDNAの上流に大腸菌、あるいはある種のバクテリオファージのプロモーター配列を接続し、それらのプロモーター配列に特異的なDNA依存RNAポリメラーゼによってin vitroでウイルスRNAを合成するものである。これまで、このような方法で感染性のあるウイルスRNAが作られたのは、Barley stripe mosaic virus<sup>93)</sup>, Barley yellow dwarf virus<sup>128)</sup>, Beet necrotic yellow vein virus<sup>99)</sup>, Brome mosaic virus<sup>6,34,88)</sup>, Cowpea chlorotic mottle virus<sup>9)</sup>, Cowpea mosaic virus<sup>123)</sup>, Cucumber mosaic virus<sup>47,106)</sup>, Tobacco mosaic virus<sup>25,79)</sup>, Tobacco rattle virus<sup>13)</sup>, Tobacco vein mottling virus<sup>29)</sup>, Turnip crinkle virus<sup>49)</sup>, Turnip yellow mosaic virus<sup>124)</sup>, White clover mosaic virus<sup>17)</sup> などである。これらのウイルスでは、DNAレベルで遺伝子組換えができるので、容易に目的の部位に点突然変異、欠失変異、挿入変異およびその結果として生じるframe shift変異等を引き起こすことができる。その結果、遺伝子の機能や非翻訳領域の役割の解析が可能となり、多くの知見が得られつつある。

遺伝子操作におけるクローニング技術は、ヘテロな核酸集団<sup>30)</sup>から単一の核酸分子を選抜しそれを大腸菌等によって増幅し均一な分子集団を得る技術である。その結果、均一な核酸集団を用いることから均一なデータが得られることになり、その核酸あるいは遺伝子が関わる生物事象を明確に解析できるようになる。しかし、その過程でもとの集団に全く存在しないような変異が偶発的に核酸配列に導



入されたり、もとの集団で極めて希な配列を持ったものが偶然選抜される危険性がある。とくに前者は、ポリメラーゼ反応に比較的間違いが多いとされる逆転写酵素を用いるcDNAクローニングの場合に深刻な問題となる<sup>42)</sup>。本章では、BMVの外被蛋白質の発現機構を探るための基本材料として上記のようなウイルスRNAの試験管内合成系の確立を試みた。その際、cDNAクローニング技術の欠点を補うために、クローニングの各過程で検定を行いながら実験を進めた。その結果、BMVの宿主であるオオムギに感染性を示すRNAを試験管内で合成できる系が確立された。以下に、その過程を詳細に述べる。

## 材料と方法

### 1. 大腸菌とプラスミド

#### 1) 大腸菌

大腸菌 [*Escherichia coli* (Migula) Cast. and Chal.]には、DH5 $\alpha$  (BRL社)、MV1184、BW313およびBMH71-18 mutS (以上は宝酒造社)の3系統を用いた。遺伝子型は、下記の通りであり、DH5 $\alpha$ は一般のクローニングやサブクローニング、MV1184は後述のファージミドベクターの宿主として一本鎖DNAの調製、BW313とBMH71-18 mutSはKunkel法<sup>69)</sup>による点突然変異体DNAの調製に用いた。

#### 大腸菌の遺伝子型

##### ・ *E. coli* DH5 $\alpha$

supE44  $\Delta$ lacU169( $\phi$  80lacZ $\Delta$ M15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1  
relA1

##### ・ *E. coli* MV1184

$\Delta$ (lac-proAB) ara rpsL thi ( $\phi$  80 lacZ $\Delta$ M15)  $\Delta$ (srl-recA)306::Tn10

(tet<sup>r</sup>) F' [traD36 proAB<sup>+</sup> lacI<sup>s</sup> lacZΔM15]

・ E. coli BW313

HfrKL16PO/ 45 [lysA(61-62)], dut1, ung1, thi-1, relA1

・ E. coli BMH71-18 mutS

Δ (lac-proAB) thi supE mutS215::Tn10(tet<sup>r</sup>) F' [proAB<sup>+</sup> lacI<sup>s</sup> lacZ  
ΔM15]

## 2) 大腸菌の保存

以下に大腸菌の系統ごとにプラスミドをもたない菌株(以下、種菌)の保存方法を挙げた。cDNAクローニング等に用いるコンピテント細胞は形質転換効率が高いことが重要である。そこで、DH5αの種菌の保存についてはHanahanの方法<sup>45)</sup>を参考にして特に慎重に行った。プラスミドをもつ菌株(以下、クローン菌)の保存は、DH5α系を使用する場合に限って行った。

・ DH5α(種菌)

市販の大腸菌懸濁液をLM寒天平面培地(付表1)に画線し、37°Cで20時間培養した。培養後、培地を掻き取らないようにして、タングステン線で2個のシングルコロニーを採取した。15 mlのポリプロピレン製遠心管(岩城硝子社、Corning<sup>TM</sup>#25317)に入れ37°Cに保温した3 mlのSOB培地(付表1)に、採取したコロニーを懸濁した後、さらに2〜3秒間激しく混和した。37°C、130rev/分で吸光度(OD<sub>550nm</sub>)が0.9〜1.1になるまで約3時間培養した後、ポリプロピレン製遠心管(Falcon社、#2059)に入れ2分間氷冷した。この大腸菌懸濁液を氷冷した3 mlの大腸菌保存液[SOB培地:グリセロール(BRL社, ultra pure)=3:2]と混和した後、氷冷したスクリュウキャップ付きポリプロピレン製遠心管(アシストチューブ、SARSTEDT社)に1 mlずつ分注した。10分間氷冷した後、液体窒素中で急冷し、-70°Cで保存した。各チューブに分注した種菌は最高4回まで使用し、それ以後は別のチューブの種菌を使用した。

・ DH5 $\alpha$  (クローン菌)

クローン菌をLB培地(付表1)に移植し、37°C、16~20時間振盪培養して得られた大腸菌懸濁液425  $\mu$ lに75  $\mu$ lのグリセロールを加え、よく混合した後、マイクロチューブに入れ、-70°Cで保存した。

・ MV1184 (種菌)

市販の大腸菌懸濁液をM9-グルコース寒天平面培地(付表2)に画線し、37°C、33時間培養し、シングルコロニーを形成させた。コロニーをM9-グルコース培地(付表2、10  $\mu$ g/mlのテトラサイクリンと30  $\mu$ g/mlのストレプトマイシンを含む)で、37°C、14時間培養し、培養液0.9 mlを0.1 mlのグリセロールと混合して-70°Cで保存した。

・ BW313 (種菌)

市販の大腸菌懸濁液をLB寒天平面培地(付表1)に画線し、37°C、27時間培養し、シングルコロニーを形成させた。コロニーをLB培地で、37°C、15時間培養し、培養液0.9 mlを0.1 mlのグリセロールと混合して-70°Cで保存した。

・ BMH71-18 mutS (種菌)

市販の大腸菌懸濁液をM9-グルコース寒天平面培地に画線し、37°C、47時間培養し、シングルコロニーを形成させた。コロニーをM9-グルコース培地(10  $\mu$ g/mlのテトラサイクリンを含む)で、37°C、15時間培養し、培養液0.9 mlを0.1 mlのグリセロールと混合して-70°Cで保存した。

### 3) プラスミド

一般のクローニングおよびサブクローニングには、pUC18、pUC19<sup>127)</sup>およびpTV118N(宝酒造社)とpBluescript SK<sup>-</sup>(Stratagene社)を用い、一本鎖DNA調製時の

サブクローニングにはファージミドベクターのpUC118とpUC119<sup>122)</sup> (宝酒造社)を用いた。dG/dCテール法を利用したcDNAクローニングには、3'-オリゴ(dG)テールpUC9(Pharmacia-LKB社)を用い、pBB シリーズのクローン作製には、pSP65<sup>81)</sup> (Promega社)を用いた。本実験で用いた6種類のベクターは、いずれも選択マーカーとしてアンピシリン耐性遺伝子を有する。

## 2. プラスミドの調製と純化

クローニングの開始または最終産物のプラスミド、あるいは複数のステップをもつサブクローニングの中間産物のうち次のステップでベクターとして用いるプラスミドの調製には、アルカリ溶菌法<sup>75)</sup> (50 ml~200 mlの大腸菌培養液を使用)を用いた。得られた粗DNAをさらに塩化セシウム平衡密度勾配遠心分離<sup>75)</sup>によって純化した。組換えDNAクロンのスクリーニングには、1.5 mlの大腸菌培養液からDNAを抽出し、RNaseによって宿主のRNAを分解し、制限酵素分析に供試した。

## 3. クローニングの一般的手順

以下にManiatisらの方法<sup>75)</sup>、種々の実験マニュアルあるいは薬品会社の推薦する条件等を参考に植物病理学研究室で確立された方法を述べる。

### 1) 制限酵素によるDNAの切断

本実験で用いた制限酵素は、宝酒造社、東洋紡績社あるいは New England Biolabs社から市販されているもので、これらの酵素を製造元の奨める条件で2時間~1晩反応させ、DNAを切断した。DNAが完全に切断されているか否かは、TAE-アガロースゲル電気泳動によって確認した。完全に切断されたDNAは、フェノール/クロロホルムで1回抽出し、3回のエーテル抽出の後、エタノール沈澱によってDNAの沈澱を得た。

## 2) 制限酵素切断末端の平滑化

制限酵素切断によって生じた突出 5' 末端には相補的に塩基を付加、また突出 3' 末端では塩基を除去することによってそれぞれ二本鎖DNAの末端を平滑にするため、以下の方法を用いた。1  $\mu$ g以下のDNAを、16.4  $\mu$ lのDWに溶解し、これに2.0  $\mu$ lの10 $\times$ バッファー (0.33 M Tris-酢酸 (pH 7.9)、0.66 M 酢酸カリウム、0.1 M 酢酸マグネシウム、5 mM ジチオスライトール (以下 DTT)、1 mg/ml 牛血清アルブミン (DNaseフリー、Pharmacia社、以下 BSA)) および1.0  $\mu$ lのdNTP液 (各2 mMのdATP, dCTP, dUTP および dTTP) を加えた後、0.6  $\mu$ lのT4 DNA ポリメラーゼ (4 units/ $\mu$ l)を加え、37°Cで10分間反応させた。反応後、フェノール/クロロホルムで1回抽出し、3回のエーテル抽出の後、エタノール沈澱によってDNAの沈澱を得た。

## 3) リンカー付加と制限酵素処理

リンカー付加はそのリンカー内にある制限酵素部位が、サブクローニングするDNA断片の内部にない場合のみ使用した。したがってDNA断片のメチル化は行わなかった。リンカー付加には、宝酒造社のLigation kitを用いた。平滑末端をもつ約1  $\mu$ gのDNAを1.5  $\mu$ lのTEバッファーに溶解し、これに1.0  $\mu$ lのりん酸化リンカー (1  $\mu$ g/ $\mu$ l)、20  $\mu$ lのA液 (反应用バッファー)、2.5  $\mu$ lのB液 (酵素溶液)を加えてよく攪拌した後、16°Cで5時間反応させた。反応後、フェノール/クロロホルムで1回抽出し、3回のエーテル抽出の後、エタノール沈澱によってDNAの沈澱を得た。この沈澱を40  $\mu$ lのDWに溶解した後、5  $\mu$ lの10 $\times$ 制限酵素バッファーと5  $\mu$ lの制限酵素 (用いたリンカーを切断するもの)を加えてよく攪拌した後、適温で一晩反応させた。反応後、TAE-アガロースゲル電気泳動に供し、リンカーの付加した目的のDNA断片を回収した。

#### 4) DNA断片のアガロースゲルからの回収

ベクタープラスミドにクローニングされたDNA断片の一部あるいは全部を別のベクタープラスミドにサブクローニングする場合、制限酵素処理後、サンプルをアガロースゲル電気泳動に供し、目的のDNA断片のみを以下の2つの方法のいずれかで回収した。通常ガラスビーズ法を用い、特に500塩基対(以下 bps)以下のDNA断片の回収には、低融点アガロース法を用いた。

##### ①ガラスビーズ法

市販のキット(GENECLEAN™ BIO 101社)を用いた。エチジウムブロミド( $0.5\mu\text{g}/\text{ml}$ )で染色したゲルにUV照射し、目的のDNA断片のバンド(2レーンでゲル容積は約 $100\mu\text{l}$ になった)をカミソリで切り出し、マイクロチューブに回収した。1 mlのTEバッファーを加えよく攪拌した後、遠心分離( $12,000\times g$ 、1秒間)し、上清を捨てた。再び同じ操作を繰り返した後、 $250\mu\text{l}$ のNaI液を加え $55^{\circ}\text{C}$ 、5分間の処理によってゲルを可溶化した。室温に戻し、 $10\mu\text{l}$ のGLASSMILKを加えよく懸濁した後、水中に10分間保った。この間、2～3分ごとに軽く攪拌した。遠心分離( $12,000\times g$ 、5秒間)後、上清を捨てた。 $500\mu\text{l}$ の氷冷したNEW液を加え、よく懸濁しGLASSMILKを完全に浮遊させた後、再び遠心分離( $12,000\times g$ 、5秒間)した。この様な洗浄と遠心分離をさらに2回繰り返し、余分なNEW液を除いた後、減圧下で5分間乾燥させた。 $75\mu\text{l}$ のTEバッファーを加え懸濁した後、 $45\sim 50^{\circ}\text{C}$ に3分間保った。遠心分離( $12,000\times g$ 、5秒間)後、上清を別のチューブに移した。沈澱にさらに $75\mu\text{l}$ のTEバッファーを加え熱処理と遠心分離を繰り返し、合計 $150\mu\text{l}$ のDNA液を得た。フェノール/クロロホルムで1回抽出し、3回のエーテル抽出の後、エタノール沈澱によってDNAの沈澱を得た。

##### ②低融点アガロース法

150 mgの低融点アガロース(BRL社、5517UA)を15 mlのTAEバッファーに加えた後、 $90\sim 100^{\circ}\text{C}$ に10分間保ちゲルを融解させた。 $37^{\circ}\text{C}$ まで冷却しゲル作製装置に流し込

み、8°Cで固化させた。8°Cで電気泳動を行った後、エチジウムブロミド(0.5  $\mu$ g/ml)で染色した。UV照射下、目的のDNA断片のバンドをカミソリで切り出し、マイクロチューブに回収した。1 mlのTEバッファーを加えよく攪拌した後、遠心分離(12,000 $\times$ g、1秒間)し、上清を捨てた。再び同じ操作を繰り返しゲルを洗浄した後、400  $\mu$ lのTEバッファーを加え65°Cに5分間保ち、ゲルを融解させた。室温まで冷却した後、フェノール抽出、フェノール/クロロホルム抽出およびクロロホルム抽出をそれぞれ1回ずつ行い、さらに3回のエーテル抽出の後、エタノール沈澱によってDNAの沈澱を得た。

#### 5) ベクターDNAの脱りん酸化(CIP処理)

ベクターDNAのセルフライゲーション(分子内での環状化)が起こると、目的のDNA断片をインサートとしてもたないコロニーが多数生じ、スクリーニングの効率が悪くなる。そこでこれを防ぐために、アルカリ性ホスファターゼによって、制限酵素で切断したベクターDNAの5'末端りん酸を除去した。約1  $\mu$ gのDNAを34  $\mu$ lのDWに溶解し、4  $\mu$ lの100 mM Tris-HCl(pH 8.0)と2  $\mu$ lの牛小腸アルカリホスファターゼ(1 unit/ $\mu$ l、Calf intestine phosphatase、Boehringer Mannheim社、以下CIP)を加え、37°Cで1時間、さらに55°Cで15分間反応させた。反応後、4  $\mu$ lの10% SDSを加え、65°Cで15分間熱処理した後、106  $\mu$ lのTEバッファーを加えた。フェノール抽出、フェノール/クロロホルム抽出およびクロロホルム抽出をそれぞれ1回ずつ行い、さらに3回のエーテル抽出の後、エタノール沈澱によってDNAの沈澱を得た。

#### 6) ライゲーション(DNAの接続)

ライゲーションには、Ligation Kit (宝酒造社)を用いた。クローニングするDNA断片とベクターDNAをそれぞれTAE-アガロースゲル電気泳動に供し、染色の後写真撮影しバンドの濃さからおよそのDNA量を求めた。接続する2ヶ所が同一の制

限酵素認識部位である場合、挿入DNAとベクターDNAのモル比が1:3になるように混合し、異なる場合は、1:1になるように混合した。混合した0.5~1  $\mu$ gのDNAにTEバッファーを加えて2  $\mu$ lにし、16  $\mu$ lのA液(反応用バッファー)と2  $\mu$ lのB液(酵素溶液)を加えてよく攪拌した後、16°Cで30分間から一晚反応させ、これを大腸菌の形質転換に供した。セルフライゲーションを行なう場合には、0.05~0.1  $\mu$ gのベクターDNAのみにTEバッファーを加えて2  $\mu$ lにし、上述と同様に反応を行った。

## 7) 大腸菌の形質転換

作製した組換えDNAによる大腸菌の形質転換は、Hanahanの方法<sup>45)</sup>に従い、植物病理学研究室で確立された方法によって行なった。

### ①形質転換のためのコンピテント細胞の調製

ここで用いた超純水は、超純水製造装置(MilliQシステム、ミリポア社)で調製した。-70°Cで保存した種菌を迅速に取り出し、ステンレス製の棒で凍結したままの菌の小片を掻き取りLM寒天平面培地(付表1)の上に置き、直ちに残りの種菌を-70°Cの冷蔵庫に戻した。タングステン線を用いて、菌を培地に画線した後、プレートを逆さまにし、37°Cで20~22時間培養した。タングステン線で2~3個のシングルコロニーをこすり取った。50 mlの滅菌済のポリプロピレン製遠心管(岩城硝子社、Corning<sup>TM</sup>#25331)に10 mlのSOB培地(付表1)を入れ、37°Cに保温したものにコロニーを懸濁し、さらに1~2秒間激しく懸濁した。37°C、130rev/分で2時間振盪培養した後、大腸菌懸濁液を15分間氷冷した。遠心分離(2,500×g、12分間、4°C)し集菌した後、上清を捨て、さらに残った泡をマイクロピペットチップの先で掻き出した。氷冷した1.5 mlのRF1液(超純水300 ml当たり、RbCl 3.6g, MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O 2.97g, 酢酸カリウム 882 mg, CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.45g, グリセロール45 ml, 0.2N 酢酸でpH 5.8に調整)を加え、軽く振って菌体を完全に懸濁した後、さらに5 mlのRF1液を加え15分間氷冷した。遠心分離(2,500×g、15分間、4°C)した後、上清を捨て4~5枚重ねたキムワイプの上に遠心管の口を叩きつけ、完全にRF1液を



除去した。氷冷した1.6 mlのRF2液(超純水80 ml当り, RbCl 96 mg,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.88g, グリセロール 12 ml, 3-(N-モルフォリノ)プロパンスルホン酸 168 mg, 0.2N NaOHでpH 6.8に調整)を加え、軽く振って菌体を懸濁し、15分間氷冷後、先を数mm切ったマイクロピペットチップで100  $\mu\text{l}$ ずつ16本の氷冷したマイクロチューブに分注した。チューブを液体窒素で急冷し40~50秒後完全に凍結した後、 $-70^\circ\text{C}$ で保存した。

## ②大腸菌の形質転換

$-70^\circ\text{C}$ で保存したコンピテント細胞を氷中に10~15分間置き、融解後ただちに、形質転換に用いるDNAを含む10  $\mu\text{l}$ 以下のライゲーション反応液を加え軽く振り混ぜ、再び氷中に30分間置いた。42 $^\circ\text{C}$ 、45秒間の熱処理を行い、氷中に2分間置いた後、900  $\mu\text{l}$ のSOC培地(20 mMグルコースを含むSOB培地)を加え軽く懸濁した後、10 mlのポリプロピレン製培養チューブ(日水製薬、#06480)に移した。37 $^\circ\text{C}$ 、120 rev/分で1時間培養した後、遠心分離(1,500  $\times g$ 、5分間、室温)し、集菌した。850  $\mu\text{l}$ の上清を捨て、残った培地到大腸菌を懸濁し、50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ のアンピシリンを含むLM寒天平面培地上に植菌した。10~20分間風乾した後、逆さまにして37 $^\circ\text{C}$ で12時間以上培養した。

## 8) 組換えDNAクローンのスクリーニング

大腸菌を組換えDNAで形質転換して得られたクローンが、どのような組換えDNAをもっているかを調べるため、Maniatisら<sup>75)</sup>による迅速破砕法と小スケールのアルカリ溶菌法を用いた。迅速破砕法では、ベクタープラスミドにDNA断片が挿入されたか否かを調べることはできるが、アルカリ溶菌法のように制限酵素による詳しい解析ができない。しかし、迅速破砕法は、短時間に非常に多くのクローンをスクリーニングできる長所をもっているので2つの方法を適当に組み合わせることによってスクリーニングの効率を上げることができた。

#### 4. オリゴヌクレオチドの合成とHPLCによる精製

DNA合成装置(Applied Biosystems社、モデル381A)を用い、目的とする塩基配列のオリゴヌクレオチドを合成した。合成は、DNAの5'端にトリチル基を付加しないモードで行った。合成終了後、合成されたオリゴヌクレオチドが吸着しているカラムを取り出し、2 mlのアンモニア水(25~28%、特級、和光純薬)を吸入した5 mlのシリンジと結合させた。シリンジからカラム内に約0.2 mlのアンモニア水を注入し、室温で15分間放置後、アンモニア水を新たにカラム内に注入することによってカラムの反対側からヌクレオチド溶液を集め、再び室温に15分間放置した。これらの操作を4回繰り返し、約1.5~2 mlのオリゴヌクレオチド溶液を集めた。この溶液を蓋つきチューブ中で55°C、一晚加熱処理し、ヌクレオチドの保護基を除去した。このヌクレオチド溶液の1/3を用い、エバポレーターで減圧乾燥した後、1.5 mlのA液(10 mM NaOH/0.5 M NaCl)に溶解し、HPLC (Pharmacia社)のサンプルとした。0.5 mlのサンプル液をMono Q HRカラムにのせ、A液で未吸着成分を完全に洗い流した。流速0.5 ml/分、合計10 mlの溶出液で10 mM NaOH(pH 12)のままNaCl濃度を0.5 M~0.9 Mに直線的に増加させ、溶出した。280nmの吸光度でモニタリングし、溶出した最大ピークを回収し、目的とするオリゴヌクレオチドの分離を行った。回収したオリゴヌクレオチド溶液のうち0.5 mlを、30 mlのDWによって平衡化したゲルろ過カラム(NAP<sup>TM</sup>-5 Column, Pharmacia社)にのせ、0.9 mlのDWで溶出した。溶出されたDNA溶液を40~45°Cで減圧濃縮した後、DWで1 µg/µlに調製した。なお、オリゴヌクレオチド溶液の濃度は、 $A_{260}/\text{mg}=50$ から測定した。

#### 5. BMV RNAへのポリ(A)付加<sup>116)</sup>

RNA1、2および3の3'端の塩基配列を決定するためにd(TTTTTTTTTTTG)をプライマーとしてジデオキシシーケンスを行った。まず、RNAの3'端にポリ(A)配列を付加した。RNA3については内部にポリ(A)配列を持つことが予想されたこと、さらに、RNA4はRNA3の3'側半分と全く同一の配列をもつことから、RNA3の3'端のシー

クエンスのためにはポリ(A)を付加したRNA4を用いた。ポリ(A)付加の前にTBE-低融点アガロースゲル電気泳動を行い、RNAを分画し $0.5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ になるようにDDWに溶解した。 $10 \mu\text{l}$ のRNA液( $0.5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ )に $53 \mu\text{l}$ のDDW、 $20 \mu\text{l}$ の5×ポリ(A)バッファ(250 mM Tris-HCl, pH 8.0, 50 mM  $\text{MgCl}_2$ , 12.5 mM  $\text{MnCl}_2$ , 1.25 M NaCl)、 $3 \mu\text{l}$ の10 mM ATP、 $1 \mu\text{l}$ の100 mM DTT、 $6.6 \mu\text{l}$ のBSA(10 mg/ml) および  $1.4 \mu\text{l}$ のRNasin(40 units/ $\mu\text{l}$ )を加えた後、 $5 \mu\text{l}$ のポリ(A)ポリメラーゼ(1.2 units/ $\mu\text{l}$ 、宝酒造社)を加え、 $37^\circ\text{C}$ 、4時間反応させた。反応後、フェノール/クロロホルム抽出とクロロホルム抽出を1回ずつ行いエタノール沈澱によってRNAを沈澱として得た。

## 6. RNAのジデオキシシークエンス法

### 1) シークエンス用プライマーの調製

RNAシークエンス用プライマーとして、RNA1、2および4の3'端にはすべてd(TTT TTTTTTTTG)を用いた。RNA1、2および3の5'端シークエンスに用いたプライマーとそれがアニールするRNAの塩基位置はそれぞれB1 d(GATAGAACTTGACAT)(75~89)、B2 d(QGTTTTCGAAGACAT)(104~118)およびB3 d(AACTATGTTAGACAT)(92~106)であった。RNA2の2a蛋白質遺伝子のすぐ下流領域にはB4 d(TAACCTTAACCAAAG)(2613~2627)を、RNA3の3a蛋白質と外被蛋白質遺伝子の間の領域にはB5 d(CGCTGCQCGCGAGT C)(1274~1288)とB6 d(TTACTGGTTGGACCC)(1324~1338)を用いた。 $[5'\text{-}^{32}\text{P}]$ プライマーの調製は以下のように行った。

$1 \mu\text{l}$ のプライマーDNA(5 pmole/ $\mu\text{l}$ )に、 $38 \mu\text{l}$ のDW、 $5 \mu\text{l}$ の10×キナーゼバッファ(500 mM Tris-HCl, pH 7.6, 100 mM  $\text{MgCl}_2$ , 50 mM DTT, 1 mM EDTAおよび1 mM スペルミジン)および $5 \mu\text{l}$ の $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP(3,000 Ci/mole,  $10 \mu\text{Ci}/\mu\text{l}$ , Amersham社)を加えた後、 $1 \mu\text{l}$ のT4ポリヌクレオチドキナーゼ(10 units/ $\mu\text{l}$ 、宝酒造社、以下 T4-PNK)を加え、 $37^\circ\text{C}$ で1時間反応させた。反応後、 $70^\circ\text{C}$ 、10分間の熱処理によって酵素を不活化し、フェノール抽出、フェノール/クロロホルム抽出、

エーテル抽出をそれぞれ1回ずつ行った後、40分間デシケーターの中で減圧しエーテルを除去した。得られた[5'-<sup>32</sup>P]プライマーをNENSORB 20カラム(Du Pont社)に添加し精製した。まず、2 mlのメタノール(HPLC用、ナカライテスク社)さらに2 mlのA液(100 mM Tris-HCl, pH 7.7, 1 mM EDTA, 10 mM トリエチルアミン)によってカラムの平衡化を行った。つぎにサンプルに2 mlのA液を加えたものをカラムに添加し吸着させた。4 mlのA液さらに3 mlのDWで未吸着成分を洗い流した後、400  $\mu$ lの50%エタノールによってプライマー-DNAを溶出した。溶出液を減圧乾燥した後、10  $\mu$ lのDDWに溶解し、0.5 pmole/ $\mu$ lとした。

## 2) シークエンス反応

ジデオキシ法によるRNAの塩基配列の決定は、Meshiらの方法<sup>78)</sup>とDeBordeらの方法<sup>27)</sup>を参考にし、植物病理学研究室で確立した以下の方法によって行った。

6  $\mu$ lのBMV RNA(0.5  $\mu$ g/ $\mu$ l)をアシストチューブにとり減圧乾燥した。RNAの乾燥沈澱を3.8  $\mu$ lのDDWに溶解した後、1  $\mu$ lの[5'-<sup>32</sup>P]プライマー (5 pmole/ $\mu$ l)と1.2  $\mu$ lの5×アニーリングバッファー(250 mM Tris-HCl, pH 7.9(42°C), 1.5 M KCl)を加えた。ふたにビニールテープを巻きチューブを密封した後、約500 mlの熱水(90°C)中に沈め5分間保った後、30°Cまで徐冷した。1サンプルにつき5本のマイクロチューブを用意し、順にA, C, G, TおよびOとマークした。チューブA、C、G、TおよびOにそれぞれ1  $\mu$ lの300  $\mu$ M ジデオキシ(以下、dd)ATP、ddCTP、ddGTP、ddTTPおよびDDWを入れ、直ちにふたをし乾燥を防いだ。徐冷後、遠心分離(12,000×g、1秒間)し、RNA-プライマー液を完全に回収した後、1.8  $\mu$ lのRNasin(40 units/ $\mu$ l、Promega社)、6.7  $\mu$ lのDDW、6.0  $\mu$ lの6×逆転写酵素バッファー (300 mM Tris-HCl, pH 7.9(42°C), 60 mM KCl, 60 mM MgCl<sub>2</sub>)、3.0  $\mu$ lの0.12 M DTT、6.0  $\mu$ lのdNTP溶液(それぞれ150  $\mu$ MのdATP, dCTP, dGTPおよびdTTP)および0.5  $\mu$ lの逆転写酵素(25 units/ $\mu$ l、RAV-2、宝酒造社)を加えよく混和した。上記のように用意した5本のチューブにこの溶液をそれぞれ5  $\mu$ lずつ分注し混ぜた後、42°Cで30分間反応させた。5本のチューブそれぞれに1  $\mu$ lのChase溶液(それぞれ1 mMのdATP,

dCTP, dGTPおよびdTTP)を加え、42°Cでさらに15分間反応させた。各チューブに4  $\mu$ lの反応停止液(0.1%(w/v) BPBと0.1%(w/v) XCを含むホルムアミド)を加え混和し、-20°Cに置いた。サンプルは2日以内に使用した。

### 3) シークエンスゲルの作製、電気泳動およびオートラジオグラフィー

電気泳動装置にはTAKARA VE-4型(宝酒造社)を用いた。ガラス板は、RNAシークエンスには60cmゲル用(200×675mm)を、DNAシークエンスには60cmゲル用と90cmゲル用(200×975mm)を用いた。アクリルアミドゲルは、6%、7.5%および20%の濃度のものを用い、常法に従ってゲルを作製した。サンプルを90~100°Cで3分間加熱し、そのうちの3  $\mu$ lをただちにゲルにのせた。1×TBEバッファー中で1750V、1.5~2時間(60cmゲル)または1350V、13時間さらに2500V、9時間(90cmゲル)の電気泳動を行なった。泳動後、凹型のガラス板をはずし、6%あるいは7.5%ゲルの場合は、ゲル面の上を適当な大きさに切ったろ紙(3MM Chr、Whatman社)で覆い、これにゲルを付着させた後、ゲルをガラス板から剝しサランラップをかけ、ゲル乾燥装置で80°C、2時間乾燥させた。20%ゲルの場合は、ゲル面の上を適当な大きさに切ったポリろ紙で覆い、注意深くゲルをガラス板から剝しサランラップをかけ、乾燥させなかった。ゲルをX線フィルム(new RX、富士写真フィルム社)に密着させ、オートラジオグラフィー用カセットに入れ、室温で24~48時間露光した後、現像した。

## 7. cDNA合成用プライマーとそのりん酸化

RNAシークエンスの結果、RNA1、2および3の3'端15塩基は全く同一であったので、cDNAの第1鎖合成にはP41 d(TGGTCTCTTTTAGAG)とP42 d(GACCTGGTCTCTTTTAGAG)を用いた。P42はRNAの3'端15塩基に相補的な配列に加えてウイルスcDNA配列の3'端に制限酵素(Tth111 I)認識部位ができるようにした。その他のcDNAの第1鎖合成に用いたプライマー、塩基配列およびそれらがRNAにハイブリダイズする部位の塩基番号は、RNA1ではP11 d(CAGAACTTTGCCGC)(2083~2097)とP12 d(AGCAATCAACTTCAG)

(96～110)、RNA2ではP21 d(TAAATAAGAATCGCG)(1610～1624)とP22 d(ACCAGTCTACA TCAC)(915～929)、RNA3ではP31 d(TCCCCACCACCCGC)(630～644)であった。第2鎖合成に用いたプライマーは、RNAの5'端シーケンスの結果をもとにし、さらに、ウイルスcDNA配列の5'端に制限酵素(SnaBI)認識部位ができるように余分な配列を加えた。RNA1ではP13 d(CCTACGTAGACCACGGAACGAGGTTC)、RNA2ではP23 d(CCTAC GTAAACCACGGAACGAGGTTC)、RNA3ではP32 d(CCTACGTAAAATACCACTAATTCT)を用いた。cDNA断片をライゲーションによってクローニングする場合は、プライマーをあらかじめりん酸化した。1  $\mu$ lのプライマーDNA(1  $\mu$ g/ $\mu$ l)に155  $\mu$ lのDDW、20  $\mu$ lの10 $\times$ T4-PNKバッファー(500 mM Tris-HCl, pH7.5, 100 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM DIT)および20  $\mu$ lの10 mM ATPを加えた後、4  $\mu$ lのT4-PNK(4 units/ $\mu$ l)を加え、37°Cで1時間反応させた。反応後、65°C、10分間の熱処理によって酵素を不活化し、フェノール抽出、NENSORB 20カラムによる精製の後、50ng/ $\mu$ lになるようにDDWに溶解した。

#### 8. GublerとHoffman法によるBMV RNAのcDNA合成とクローニング

5'端と3'端に欠失をもちながらも長いcDNAを合成する際には、GublerとHoffman法<sup>44)</sup>を用いた。反応は、cDNA合成キット(Boehringer Mannheim社)を用いて行った。3'端非翻訳領域を含むcDNAの合成にはTBE-低融点アガロースゲル電気泳動によって分画したRNAを用い、それ以外のcDNA合成には未分画のRNAを用いた。1回の反応(20  $\mu$ l)では、鋳型として2.5  $\mu$ gのBMV RNAを用い、プライマーとして250ngのオリゴヌクレオチドを用いた。合成された二本鎖cDNAを[dG-dC]テーリング法によってプラスミドpUC9のPstI部位に導入し、E. coli DH5 $\alpha$ 株を形質転換した。

#### 9. BMV RNAの正確な3'端を含むcDNAの合成、クローニング<sup>75)</sup>

cDNA合成キットを用い20  $\mu$ lの反応液で、5  $\mu$ gの分画したRNA、500ngのプライマーP42を用いて第1鎖cDNAを合成した。反応後、0.8  $\mu$ lの0.5 M EDTA、10  $\mu$ lの150

mM NaOHを加え65°C、1時間熱処理し鋸型RNAを分解した。10  $\mu$ lの1 M Tris-HCl (pH 8.0)、10  $\mu$ lの1 M HClを加え中和した後、2回のフェノール/クロロホルム抽出、エタノール沈澱によってcDNAを沈澱として得た。沈澱を56  $\mu$ lのDWに溶解した後、20  $\mu$ lの5 $\times$ クレノー断片バッファー(340 mM Tris-HCl, pH 7.5, 34 mM MgCl<sub>2</sub>, 34 mM DTT)、20  $\mu$ lのdNTP溶液(それぞれ5 mMのdATP, dCTP, dGTPおよびdTTP)および4  $\mu$ lのクレノー断片(4.2 units/ $\mu$ l, Large Fragment *E. coli* DNA Polymerase I、宝酒造社)を加え、20°Cで16時間反応させた。2回のフェノール/クロロホルム抽出、エタノール沈澱によって5'末端がヘアピン構造をとる二本鎖cDNAを沈澱として得た。沈澱をDWに溶解し、50  $\mu$ lの反応液で、12 unitsの制限酵素 *Sac* Iで37°C、4時間反応させ、ヘアピン構造をもつDNA断片と3'端領域を持つDNA断片に分けた。2回のフェノール/クロロホルム抽出、エタノール沈澱によって二本鎖cDNAを沈澱として得た。合成された二本鎖cDNAを[dG-dC]テーリング法<sup>44)</sup>によってプラスミドpUC9の*Pst* I部位に導入し、*E. coli* DH5 $\alpha$ 株を形質転換した。

#### 10. BMV RNAの正確な5'端を含むcDNAの合成、クローニング<sup>6)</sup>

第一鎖合成は、上述と同様にcDNA合成キットを用いて行った。RNA1、2および3のcDNA合成には、それぞれ100、20および10  $\mu$ gの未分画のBMV RNAを鋸型として用い、それぞれ750、150および75ngのりん酸化したオリゴヌクレオチドをプライマーとして用いた。50  $\mu$ lの反応液中で第一鎖合成を行った後、0.25  $\mu$ g/ $\mu$ lとなるようにリボヌクレアーゼ A(Sigma社)を加え、42°Cで30分間処理し、鋸型RNAを分解した。処理後、反応液をNENSORB 20カラムによって精製した。得られた沈澱を8  $\mu$ lのDWに溶解し、1  $\mu$ lのりん酸化オリゴヌクレオチド(第二鎖合成用プライマー、50ng/ $\mu$ l)および1  $\mu$ lのアニーリング用バッファー (100 mM Tris-HCl, pH 7.5, 100 mM MgCl<sub>2</sub>, 500 mM NaCl)を加えた後、シリコナイズしたガラスキャピラリーに反応液を入れ両端を閉じた。このキャピラリーを100°Cで3分間保った後、ただちに同じく100°Cの液(50 ml)の入ったポリプロピレン製遠心管 (岩城ガラス社、Corning<sup>TM</sup>、#25331)に移し、室温に置き30分間徐冷した。キャピラリーから反応

溶液を回収した後、3.6  $\mu$ lのdNTP溶液（それぞれ2 mMのdATP, dCTP, dGTPおよびdTTP）、1  $\mu$ lの100 mM DTTおよび1.5  $\mu$ lのクレノー断片（8 units/ $\mu$ l）を加え、22  $^{\circ}$ Cで2時間反応させた。得られたRNA1、2および3に対する2本鎖cDNAをそれぞれ制限酵素Cla I、Nco I およびCla I で切断し、pBluescriptのSma I /Cla I 部位、pTV 118NのSma I /Nco I 部位およびpBluescriptのSma I /Cla I 部位に挿入し、*E. coli* DH5  $\alpha$  株を形質転換した。

#### 1 1. 転写ベクター(pUCT)の作製<sup>78)</sup>

2種のオリゴヌクレオチドd(CTAGATGCATATAGTGAGTCGTATTAAATTTA)とd(AGCITAAATTAATACGACTCACTATATGCAT)をそれぞれ0.25  $\mu$ gずつりん酸化した後混合し、NENSOR B 20で精製し乾燥沈澱を得た。5  $\mu$ lのアニーリングバッファー（100 mM Tris-HCl, pH 7.6, 6.5 mM MgCl<sub>2</sub>）に溶解させた後、シリコナイズしたガラスキャピラリー中に密封し、75  $^{\circ}$ Cで5分間保った後、徐冷した。Hind III/Xba I で切断しCIP処理した0.1  $\mu$ gのpUC19を、キャピラリーから回収した1  $\mu$ lの反応溶液とライゲーションし、*E. coli* DH5  $\alpha$  株を形質転換した。得られたプラスミドをpUCTとした。

#### 1 2. *In vitro* BMV RNAの転写<sup>7)</sup>

T7プロモーターのすぐ下流にBMVの各RNAに対応する全長cDNAが挿入され、さらにそのすぐ下流にEcoR I 部位が存在する種々のプラスミドDNAを塩化セシウム遠心分離によって精製した。これらのDNA30  $\mu$ gをEcoR I で切断した後、フェノール/クロロホルム抽出、クロロホルム抽出を行いエタノール沈澱して得られた沈澱をDDWに溶解し、0.5 mg/mlとした。6  $\mu$ lの直鎖化DNA(0.5 mg/ml)に10  $\mu$ lの5 $\times$ 転写バッファー（200 mM Tris-HCl, pH 7.5, 30 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mMスベルミジン, 50 mM NaCl）、5  $\mu$ lの100 mM DTT、1.8  $\mu$ lのBSA（2.8 mg/ml）、2.5  $\mu$ lのRNasin（40 units/ $\mu$ l）、2.5  $\mu$ lの10 mM ATP、2.5  $\mu$ lの10 mM CTP、2.5  $\mu$ lの10 mM UTP、0.4  $\mu$ lの10 mM GTPおよび5  $\mu$ lの5 mM m<sup>7</sup>GpppG(New England Biolabs)を加え、軽



く混ぜた後、0.5  $\mu$ lのT7 RNAポリメラーゼ (50 units/ $\mu$ l)を加え、37°Cで反応させた。1時間後、さらに2  $\mu$ lの10 mM GTPおよび1  $\mu$ lのT7 RNAポリメラーゼを加え、37°Cで1時間反応させた。1.3  $\mu$ lのDNase(1 unit/ $\mu$ l、DNase-RQ1、Promega社)を加え37°Cで15分間反応させ、鋳型DNAを分解した後、フェノール/クロロホルム抽出、クロロホルム抽出をそれぞれ1回ずつ行った。植物あるいはプロトプラストに接種する場合は、そのまま20  $\mu$ gのtRNAをキャリアとしてエタノール沈澱し、10  $\mu$ lのDDWに溶解した。In vitro翻訳系に加える場合は、未反応のキャップアナログ( $m^7$ GpppG)を除くためにゲルろ過した。すなわち、反応液にDDWを加えて100  $\mu$ lにした後、25 mlのDDWで平衡化したカラム(NICK Column、Pharmacia社)に添加した。400  $\mu$ lのDDWを添加し、さらに300  $\mu$ lのDDWを添加し、RNA溶液を回収した。このRNA溶液をキャリアなしでエタノール沈澱し、10  $\mu$ lのDDWに溶解した。

### 1 3. オオムギあるいはChenopodium hybridumへのin vitro転写産物の接種

In vitro転写産物に等量の2×接種バッファー (100 mM Tris- $H_3PO_4$ , pH 8.0, 500 mM NaCl, 10 mM EDTA, 1%(w/v)ベントナイト)を加え、接種液とした<sup>7)</sup>。パラフィルム(American National Can社)を5cm×10cmに切り、保護された面を上にして、その上に軽くカーボランダム(600メッシュ)を振りかけた。そこに5~10  $\mu$ lの接種液滴を置き、人差指でカーボランダムと軽く混合した後、液滴をすくい取り、植物の葉に塗抹接種した。接種後、直ちに葉上のカーボランダムを水道水で洗い流した。また、接種する葉を代えるごとに、流水で丹念に指を洗った。

### 1 4. オオムギプロトプラストへのin vitro転写産物の接種

#### 1) プロトプラストの調製<sup>9,1)</sup>

プロトプラストの調製には、播種5-6日後のオオムギ第一葉を用いた。刈り取ったオオムギ葉の背軸側表皮を剝離し、100 mlコルベンに入れた1% セルラーゼR

-10(近畿ヤクルト社)を含む0.5 M マンニトール液(KOHでpH 5.6~5.8に調整)に浸し、30分ごとにコルベンを軽く振り混ぜ、26°Cで2時間処理した。得られたプロトプラスト懸濁液に含まれる未分解組織を、4~6層のガーゼでろ別し、50 ml用ガラス遠心管に移し、遠心分離(100×g、3分間)によってプロトプラストを集め、さらに、0.5 Mのマンニトールによる遠心洗浄を2回繰り返した。

## 2) プロトプラストへのin vitro転写産物の接種

オオムギプロトプラストへのRNA接種はすでにOkunoとFurusawa<sup>9,1)</sup>によってポリカチオンとRNAの複合体を形成させて感染させる方法が報告されている。この方法は高い感染効率が得られるにもかかわらず、RNA濃度を正確に調べる必要がある。本実験では、感染効率は低いながらもRNA量を厳密に調べる必要のないPEG法を用いた。Ballasら<sup>14)</sup>がプロトプラストへのDNA接種に用いた方法を参考にし、植物病理学研究室で確立された方法を以下に述べた。

0.5 Mマンニトールに懸濁したプロトプラストを4~6本の10 ml用のポリプロピレン製培養チューブ(日水製薬、#06480)に移し、遠心分離(100×g、3分間)でプロトプラストを集め、上清をできる限り除去した。プロトプラストペレットに2~10 µgのBMV RNAあるいはin vitro転写産物と10 µgのtRNAを含む0.7 mlのT液(0.5 Mマンニトール、40 mM CaCl<sub>2</sub>)を加えよく混和した後、直ちに0.7 mlのPEG溶液(40%(w/v)ポリエチレングリコール<M.W.4000>、0.5 Mマンニトール、40 mM CaCl<sub>2</sub>)を加え、上下逆さまにして緩やかに混和し、さらに、氷中で30分間低速で振盪した。その後、約8 mlのT液を加え上下逆さまにして緩やかに混ぜ、氷中に30分間静置した。遠心分離(100×g、3分間)でプロトプラストを集め、PEGや未吸着のRNAを除去するためプロトプラストをHigh-pH, High-Ca<sup>2+</sup>バッファー(0.7 Mマンニトール、50 mM CaCl<sub>2</sub>、50 mM グリシン、KOHでpH 8.5に調整)で3回遠心洗浄した。プロトプラストを1.5 mlの0.7i培地(0.2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、1 mM KNO<sub>3</sub>、1 mM MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O、10 mM CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O、1 M KI、0.01 M CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O、0.7 Mマンニトール、pH 6.5)に懸濁し、26°Cで24時間培養した。糸状菌や細菌の生育を防止するため2500

units/mlのマイコスタチンと200  $\mu$ g/mlのクロラムフェニコールを培地に加えた。

### 3) ウイルスRNAおよびウイルス蛋白質の分析

RNAを分析する場合は、培養開始24時間後に [ $^3$ H]ウリジンとアクチノマイシンDをそれぞれ10  $\mu$ Ci/ml、20  $\mu$ g/mlとなるように培地に加え、3時間パルスラベルした。遠心分離(100 $\times$ g、3分間)によってプロトプラストを集めた後、100  $\mu$ lになるようにTEバッファーを加え、さらに100  $\mu$ lのRNA抽出バッファーを加えた。2回のフェノール抽出の後、それぞれ1回のフェノール/クロロホルム抽出、クロロホルム抽出およびエーテル抽出を行い、エタノール沈澱によって核酸沈澱を得た。これを3.5%ゲル濃度の尿素-ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって分離した後、フルオログラフィーによって分析した。蛋白質を分析する場合は、培養24時間後に、プロトプラストを集め、160  $\mu$ lのクラッキングバッファー中で処理したものをSDS-12.5% PAGEで分離した。ウイルス蛋白質の検出は、1a、2a、3a蛋白質およびBMV粒子に対する抗体を混合して一次抗体として用い、ウエスタンブロッティング法によって行った。

## 結 果

### 1. BMV RNAの末端塩基配列の決定

GublerとHoffman法<sup>44)</sup>では、第2鎖合成に大腸菌DNAポリメラーゼIがもっている5'→3'エキソヌクレアーゼ活性を利用しているが、逆にこの活性によって正確な末端配列を含むcDNAを合成することができない。そこで、3'および5'両末端を含むcDNAの合成は、合成オリゴヌクレオチドをプライマーとして用い、5'→3'エキソヌクレアーゼ活性のないクレノー断片によって行った。

プライマー合成の前に、まず、BMVのゲノムRNAの末端塩基配列を決定した。

RNAの3'末端の塩基配列を決定するために、RNAの3'端にポリ(A)を付加した後、d[(T)<sub>12</sub>G]をプライマーとしてジデオキシシーケンスを行った<sup>117)</sup>。BMVをはじめ多くの植物RNAウイルスの3'末端は、CCAで終わっている<sup>41)</sup>ので、ここにポリ(A)を付加することでd[(T)<sub>12</sub>G]がハイブリダイズし、シーケンスできる。オートラジオグラムにあらわれるバンドは鋳型RNAの3'端から3塩基めのCから始まるものだけになる。RNA3内部にポリ(A)配列をもつと予想されたこと<sup>3)</sup>、およびRNA4はRNA3の3'側半分と全く同一の配列をもっていることから、RNA3の3'端のシーケンスにはRNA4を用いた。RNA1、2および4を分画し、それぞれ塩基配列を決定したところ、すべて3'端15塩基は、5'CUCUAAAAGAGACCA3'であった。図4にRNA4の結果を示した。したがって、cDNA合成のプライマーとしてこの配列に相補的なd(TGGTCTCTTTAGAG)を合成した。

RNAの5'端のシーケンスにもジデオキシ法を用い、そのプライマーはすでに全塩基配列の決定されたBMV Russian株のデータをもとに合成した。Russian株とATCC66株の塩基配列が同一であるかどうかわからないが、シーケンスの相同性がある程度高い場合、プライマーは鋳型のRNAにハイブリダイズする。逆転写酵素によってシーケンス反応が進むためには、最小限プライマーの3'端が鋳型RNAにハイブリダイズすることが重要である。そこで、プライマーは各RNAの5'端付近に存在する各遺伝子の翻訳開始コドン(5'AUG3')に相補的な配列d(CAT)をプライマーの3'端とするようにデザインし合成した。これらのプライマーを用いてシーケンスした結果、それぞれ5'端のキャップ構造に相当すると思われる強いストップシグナルが現れ、5'端非翻訳領域の全塩基配列が分かった(図5)。ストップシグナルの泳動度から5'端非翻訳領域の長さは、RNA2、RNA3、RNA1の順に長いことがわかった。

## 2. BMV RNAに対する全長cDNAの作製

### 1) BMV RNAの全翻訳領域に対するcDNAクローンの作製

5'および3'両末端領域を完全に含む完全長cDNAを作製する前に、まず、BMV RNAの全翻訳領域に対するcDNAをGublerとHoffman法<sup>4,4)</sup>で作製した。分画したRNAを用いた場合でも、P41を第1鎖用プライマーにして得られたcDNAは目的以外のRNAに由来するものも含んでいた。これは、RNA1、2および3の3'端が同一であるため共通のプライマー(P41)を用いていること、さらにこれは分画したRNAの中に目的以外のゲノムRNAが混入していたこととによると考えられた。そこでこのようなcDNAクローンのスクリーニングには、BMV Russian系統の塩基配列<sup>3,4)</sup>をもとに作製した制限酵素地図を利用し、それぞれのcDNAクローンがどのRNAに由来するかを調べた。

#### ①1a遺伝子のcDNAの作製

分画したRNA1を用い、P41を第1鎖用プライマーにしてRNA1の3'端側約1/3の領域を含むpB1#4021を得た。未分画のRNAを用い、P11をプライマーにしてRNA1の5'端側約2/3の領域を含むpB1#5161とpB1#5162を得た。以下、pUC系プラスミドのマルチクローニングサイト<sup>127)</sup>中の制限酵素部位には、MCSと明記し、またcDNA中の制限酵素部位の場合、認識配列の最も5'末端側の塩基が対象とするRNAの5'端から数えて何塩基目に相当するかをNの後に数字で表した。つぎに、RNA1の5'末端側を含むcDNAおよび3'末端側を含むcDNA中の重複する領域に存在する制限酵素部位を用いてそれぞれのcDNAをつなぎ合せ、1a遺伝子の全領域を含むcDNAをもつ転写ベクターの作製を試みた。pB1#5161およびpB1#5162のHindIII(N1290)/EcoRI(MCS)処理cDNA断片を転写ベクターpSP65のHindIII(MCS)/EcoRI(MCS)部位に挿入し、それぞれpB1#5163およびpB1#5164を作製した。一方、pB1#5161およびpB1#5162のSmaI(N961)/SphI(N2049)処理cDNA断片をSmaI(MCS)/SphI(N2049)処理したpB1#4021の大断片とライゲーションし、それぞれpB1#5165およびpB1#5166を得た。pB1#5165およびpB1#5166のHindIII(N1290とMCS)処理cDNA断片をそれぞれ、HindIII(N1290)処理したpB1#5163およびpB1#5164に正方向に挿入し、1a遺伝子の全領域を含むcDNAをもつ転写ベクターpB1#5167およびpB1#5168を作製した(図6)。

## ②2a遺伝子のcDNAの作製

分画したRNA2を用い、P41を第1鎖用プライマーにしてRNA2の3'端側約1/2の領域を含むpB2#4161を得た。未分画のRNAを用い、P21をプライマーにしてRNA2の5'端側約1/2の領域をカバーするpB2#6161とpB2#6162を得た。pB2#6161およびpB2#6162のEcoR I (MCS)/HindIII (MCS)処理cDNA断片を転写ベクターpSP65のEcoR I (MCS)/HindIII (MCS)部位に挿入しプラスミドpB2#6163およびpB2#6164を作製した。pB2#4161のEcoRV (N1438)/HindIII (N2665)処理cDNA断片をEcoRV (N1438)/HindIII (MCS)処理したpB2#6163およびpB2#6164の大断片とライゲーションし、2a遺伝子の全領域をカバーするcDNAを含む転写ベクターpB2#6165およびpB2#6166を作製した(図6)。

## ③1aおよび2a遺伝子に対するcDNAの転写およびin vitro翻訳

cDNAの第1鎖および第2鎖合成の過程で逆転写酵素あるいは大腸菌DNAポリメラーゼ I によるDNA合成の誤りによって、本来のウイルスの蛋白質遺伝子の読み枠に変化が生じることがある<sup>42)</sup>。そこで作製した1aおよび2a遺伝子のcDNAをin vitro転写系に加えRNAを合成した。得られた転写RNAとウイルス粒子から調製されたRNAとをin vitro翻訳系に加えて合成された蛋白質の分子量を比べ、各クローンのcDNA中の遺伝子の読み枠が正しいかどうかを調べた。それぞれ1aおよび2a遺伝子のcDNAを含む転写ベクターpB1#5167とpB1#5168およびpB2#6165とpB2#6166を3'末端の非翻訳領域にある制限酵素認識部位Xho I およびHindIIIでそれぞれ直鎖化したのち、ファージSP6のRNAポリメラーゼによって転写し<sup>81)</sup>、これら4種の転写産物をin vitro翻訳系に加えて翻訳した。その結果、pB1#5168の転写物を除いて他の3種の転写物からは予想された分子量の蛋白質が合成された(図7)。

## ④RNA3のほぼ全域を含むcDNAの作製

未分画のRNAを用い、P41をプライマーにしてRNA3のほぼ完全長のcDNAを含むpB3#875を得た。

## 2) BMV RNAの正確な3'端を含むcDNAクローンの作製

#### ①ウイルス配列の3'端にTth111 I 認識部位をもつcDNAクローンの作製

BMV RNAの正確な3'端を含むcDNAクローンを得るには、第1鎖合成にプライマーP41を用いてもよいが、これを[dC-dG]テール法でプラスミドに挿入するとウイルス配列の3'端で正確に切断することができない。そこでプライマーP42を用い、cDNAを合成した。分画したRNAを用い、P42をプライマーにして第1鎖を合成し、セルフプライミングによって第2鎖をクレノー断片を用いて合成した。その結果5'端側にできるヘアピン構造は、通常ヌクレアーゼS1で除去するが、これが3'端側にも何らかの影響を及ぼすのを防ぐために制限酵素Sac Iによって切断した。Sac Iは、BMV Russian系統の制限酵素地図をもとにするとその認識部位がRNA1、RNA2およびRNA3で3'端からそれぞれ308、489および637塩基と適当な位置にあり、また、Sac I切断によって生じる3'突出末端は、dCテールを付加させる際用いるターミナルデオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼの鋳型になり易いことから、本制限酵素部位を選んだ。得られたクローンからDNAを調製し、制限酵素地図を作製し、目的のクローンの1次スクリーニングを行った。ポジティブクローンについては、さらにTth111 Iで切断しクローンを選んだ。この2次スクリーニングにおけるネガティブクローンは、cDNA合成に用いた酵素のもつヌクレアーゼ活性などでcDNAの末端配列が失われたものであると考えた。この結果、RNA1、RNA2およびRNA3の正確な3'端を含むcDNAクローンpBT1、pBT2およびpBT3を得た。

それぞれのcDNAインサートを適当な制限酵素を用いて230~240塩基対にそろえ、転写ベクターpSP65<sup>8,11)</sup>に正方向に挿入しpBSP104、pBSP204およびpBSP304を作製した。Tth111 Iで切断した後、ファージSP6のRNAポリメラーゼによって転写し転写RNAを得た。これらのRNAの3'端は、ウイルスRNAと同じCCAで終わる。これらをBMV感染オオムギ葉から抽出したBMV レプリカーゼの系<sup>7,4)</sup>に加えたところ、いずれの転写RNAも酵素の鋳型となり、反応産物として2本鎖RNAが検出された(図8)。この結果、得られたcDNAクローンにin vitroでの生物活性があることが認められた。

## ②ウイルス配列の3'端にEcoR I 認識部位をもつcDNAクローンの作製

制限酵素Tth111 I の認識部位は、pB1#5167、pB2#6166およびpB3#875のすべてにおいてcDNA内部にも存在していたので、後で本酵素による全長cDNAのrun-off転写ができない。そこで、ウイルスRNA配列の3'端にEcoR I 部位の導入を試みた<sup>6)</sup>。pBT1をTth111 I (N3230)/Sma I (MCS)処理したのち平滑化し、セルフライゲーションすることによって余分なdC/dG配列とポリリンカー配列のないpBT1.2を得た。pBT1.2をPst I (MCS)、平滑化およびEcoR I (MCS)処理して得られたcDNA断片を、転写ベクターpSP65のSma I /EcoR I 部位に挿入し、pBT11(図6)を得た。pBT2をTth111 I (N2861)/Sma I (MCS)処理したのち平滑化し、セルフライゲーションによってpBT2.2を得た。プラスミドpBT2.2のEcoR I (MCS)/Sac I (N2372)処理cDNA断片を転写ベクターpSP65のEcoR I /Sac I 部位に挿入し、pBT21(図6)を得た。pBT3をTth111 I (N1881とN2113)、平滑化およびHindIII (N1917)処理して得られた約200塩基対のcDNA断片をpUC9のSma I /HindIII部位に挿入しプラスミドpBT31(図6)を作製した。

## 3) BMV RNAの正確な5'端を含むcDNAクローンの作製

上述のように、cDNA合成の際に末端の塩基は酵素に混入している未知のヌクレアーゼ活性などによってしばしば消化されることがある<sup>6,1)</sup>。したがって、合成されたcDNAにウイルス配列の5'端配列が保持されているかどうかを調べるために、また、cDNAを正確に5'末端で切りだすことができるように、第2鎖合成のプライマーとしては、ウイルスRNAの5'末端配列に余分な配列d(TAC)を加え、新たに制限酵素認識部位(SnaB I)をつくるようにデザインしたプライマーを用いcDNA合成を行った。プライマーの5'端のd(CC)配列は、未知のヌクレアーゼ活性などによる末端塩基配列の消失の可能性をできるだけ低くするために加えた。RNA1とRNA3のcDNAは第2鎖合成後、Cla I (RNA1はN87、RNA3はN560)で切断し、得られた大きい方の断片をpBluescriptのCla I (MCS)/Sma I (MCS)部位に挿入し、それぞれpB1CS1(図6)およびpB3CS(図6)を作製した。また、RNA2のcDNAは第2鎖合成後、Nco I (N882)で切断し、得られた大きい方の断片をpTV118NのSma I (MCS)/Nco I (MCS)部位に挿



入し、pB2NS(図6)を作製した。

#### 4) 完全長cDNAを含むプラスミドクローン(pBBシリーズ)の作製

BMV RNAの正確な5'および3'末端を含むcDNAクローンならびに翻訳領域のcDNAクローンを適当な制限酵素認識部位を用いてつなぎ合せてBMV RNA1、2および3に対する完全長cDNAクローン(pBB1、pBB2およびpBB3)を作製した。pBB1、2および3をそれぞれSnaB I / EcoR I で処理することによって5'末端に余分な配列をもたず、3'末端に7塩基が付加されたRNA1、2および3に対する完全長cDNA断片を得ることができる。また、SnaB I で切断した後、SP6ポリメラーゼを加えることによって正確な3'末端を持つマイナス鎖RNAを合成できる。

##### ①RNA1の完全長cDNAクローン(pBB1)の作製

pB1#5167のCla I (N87)/Kpn I (N685)処理cDNA断片をCla I (N87)/Kpn I (MCS)処理したpB1CS1の大断片とライゲーションし、pBT1.7を作製した。つぎに、pBT1.7にKpn I (N685)および平滑化処理を行った後、平滑化した両末端にBamH I リンカーを付加し、さらにBamH I 処理によって両末端にBamH I 部位をもつcDNA断片を得た。その断片をpBT11のBamH I (MCS)部位に正方向に挿入し、pBT1.8を作製した。最後に、pB1#5167のMlu I (N668)/Xho I (N2988)処理cDNA断片をMlu I (N688)/Xho I (N2988)処理したpBT1.8の大断片とライゲーションし、RNA1の完全長cDNA断片を含むpBB1(図6)を得た。

##### ②RNA2の完全長cDNAクローン(pBB2)の作製

pB2NSをBamH I (MCS)、平滑化およびNco I (N882)処理した後、得られたcDNA断片をSma I (MCS)/Nco I (N882)処理したpB2#6166の大断片とライゲーションしpB2NS6166を得た。pB2NS6166をEcoR I (MCS)、平滑化およびSac I (N2372)処理した後、得られたcDNA断片をSma I (MCS)/Sac I (N2372)処理したpBT21の大断片とライゲーションし、RNA2の完全長cDNAを含むpBB2(図6)を得た。

### ③RNA3の完全長cDNAクローン(pBB3)の作製

pB3#875のcDNA断片を同じベクターpUC9に逆方向に挿入し、pB3#875Rを得た。pB3#875RのHindIII (MCSとN1917)断片をpBT31のHindIII (N1917)部位に正方向に挿入し、pBT3.2を作製した。つぎに、pB3CSにBamHI (MCS)および平滑化処理を行った後、平滑末端にPst I リンカーを付加し、さらにCla I (N600)およびPst I 処理によって600塩基対のcDNA断片を得た。この断片をPst I (MCS)/Cla I (N600)処理したpBT3.2の大断片とライゲーションし、pBSF875R(図6)を作製した。最後に、pBSF875RのPst I (MCS)/EcoR I (MCS)断片を転写ベクターpSP65のPst I /EcoR I 部位にクローニングしRNA3の全長cDNAを含むpBB3(図6)を得た。

### 3. 転写ベクター(pUCT)の作製および全長cDNAの転写ベクターへの挿入

BMV RNAを試験管内で合成するにはDNA依存RNA合成酵素が不可欠である。DNA依存RNA合成酵素にはT7 RNAポリメラーゼ、SP6 RNAポリメラーゼおよび大腸菌RNAポリメラーゼなどが市販されているが、本実験ではプロモーター領域の塩基配列ならびに転写開始点が正確にわかっており、また、安価で高い活性をもつ酵素が得られることから、T7 RNAポリメラーゼを用いた試験管内BMV RNA合成系を作成した。ウイルスRNAの5'末端の構造はウイルスRNAの複製や翻訳などにおいて非常に重要な機能をもっており、5'末端に余分な塩基配列が付加されるとウイルスRNAの生物活性は激減することが知られている<sup>57)</sup>。野生型と同じ5'末端の塩基配列をもつウイルスRNAを試験管内で合成するには、cDNAの5'末端から正確に転写が開始されなければならない。したがって、転写開始点を平滑末端化しBMV RNAの全長cDNAを挿入するために、T7プロモーターの転写開始点に制限酵素認識部位(Nsi I)を導入した<sup>70)</sup>。

T7プロモーターのコンセンサス配列とそのすぐ下流にNsi I 部位をもつ転写ベクターpUCTを作製した(図9)。pUCTを制限酵素Nsi I で処理すると3'突出末端を生じる。これにT4DNAポリメラーゼによる平滑化処理を行うことによって、T7プロモ-

ターの転写開始点より下流の塩基を除去し、開始点のすぐ隣りの塩基対で平滑末端を形成させることができる。pBB1、pBB2およびpBB3のSnaB I /EcoR I断片をNsi I、T4DNAポリメラーゼおよびEcoR I処理を行った転写ベクターpUCTの大断片とライゲーションすることによって、BMV RNA1、2および3それぞれの転写ベクターpBTF1、pBTF2およびpBTF3を作製した(図6、9)。

#### 4. BMVゲノムRNAの全長cDNAの転写および転写物の特性

BMV RNAの5'末端にはmRNAと同様にキャップ構造が存在するので転写の際に反応基質にキャップアナログを加え、転写物の5'末端のキャッピングを行った。また、転写反応が3'末端の7塩基下流で停止(Run-off 転写)するように鋳型DNAをEcoR I部位で切断し、直鎖化した。転写ベクターpBTF1、pBTF2、pBTF3をEcoR Iで直鎖化したものを鋳型として用いキャップアナログ存在下でT7 RNAポリメラーゼによってBMV RNA1、2および3の全長cDNAの転写物を得た。これ以後、pBTF1、pBTF2およびpBTF3の転写RNA産物をF1、F2およびF3とする。合成された転写RNAの分子量をTBE-アガロースゲル電気泳動によって分析した結果、F1、F2およびF3はそれぞれ粒子から純化したBMV RNA1、2および3と同一の泳動度を示した(図10)。鋳型DNAあたりの転写量はF1が最も高く、続いてF2、F3の順であった。pBTF3の転写産物の中にRNA4と同じ泳動度を示すバンドが認められ、これは、pBTF3のcDNAの中央部にあるRNA4の転写開始点からT7 RNAポリメラーゼによって転写が行なわれた可能性が考えられた。このことを確かめるために、pBTF3のcDNA中の3a蛋白質遺伝子と外被蛋白質遺伝子部分にそれぞれ約120塩基対と280塩基対の欠失をもつ突然変異体pBM30とpBM40を作製した。pBM30とpBM40をEcoR Iで切断しT7 RNAポリメラーゼで転写させたところ、ともにRNA3に相当するバンドは短くなっていたが、RNA4に相当するバンドは、pBM30では短くなっておりpBM40ではpBTF3のRNA4に相当するバンドと同じ泳動度を示した。この結果、RNA4と同じ泳動度を示したバンドは、cDNAの内部から転写されたものではなく、F3と同じ位置から転写開始されたものが、何らかの原因で途中で停止した結果の産物であることが分かった。F1、F2およびF3

を混合して全身感染宿主であるオオムギの第1葉に接種すると、粒子から純化したBMV RNAを接種した場合と同様の病徴が第2葉および第3葉で認められ(図11)、また、病徴出現に要した接種後の日数も同じであった。また、感染葉からウイルス粒子さらにはウイルスRNAを純化し、TBE-アガロースゲル電気泳動によって分析した結果、転写物を接種した区とウイルス粒子由来のRNAを接種した区との間でウイルス粒子にパッケージングされたRNAの量と質に差異は認められなかった(図12)。一方、同様の実験をオオムギプロトプラストを用いて行い、ウエスタンブロッティング法によってウイルス蛋白質を分析したところ、転写産物と粒子RNAの間に差異は見られず外被蛋白質は2種類検出された(図13)。さらに、転写産物をBMVの局部病斑植物である *Chenopodium hybridum* に接種したところ、接種3～4日後にBMV特有の局部病斑が現われた(図14)。以上の結果から、ここで作製したBMV RNA1、2および3に対する各cDNAクローンは目的とした完全長ウイルスゲノムRNAのcDNAであることが明きらかとなった。

## 考 察

本章では、BMV ATCC66系統のRNAの全長cDNAを用いたウイルスRNAの試験管内合成系を作成した。BMVではAhlquistら(1984年)によって、Russian系統においてゲノムRNAの完全長cDNAがクローニングされ、その全長cDNAから試験管内転写反応により、生物活性を示す転写RNAが合成されている<sup>6,7)</sup>。BMVはゲノムをRNA1、RNA2およびRNA3に分けて持ついわゆる分節ゲノム構造をとっている。したがって、分子量の最も大きいRNA1でも約3,000塩基であり、一段階のcDNA合成によって全長cDNAを得ることが比較的容易である。Ahlquistらは第一鎖および第二鎖合成用のプライマーとして合成オリゴヌクレオチドを用い、一段階のcDNA合成で各ゲノムRNAに対する全長cDNAをクローニングした。一方、ゲノムサイズが大きく分節ゲノム構造をとらないTobacco vein mottling virusにおいては、いくつかのcDNA断片を個々にクローニングした後、適当な制限酵素を用いてつなぎ合わせる方法で全

長cDNAが得られている<sup>29)</sup>。本実験を行う前に予備的にcDNA合成を行ったところ、全長cDNAを得るのが容易でなかったこと、およびRussian系統において報告された塩基配列のデータ<sup>3, 4)</sup>から作製した制限酵素地図がATCC66系統にもかなり有効に利用できるのが分かったことから、BMV ATCC66系統の全長cDNAをクローニングする方法として、後者を選んだ。

逆転写酵素は、一般にポリメラーゼ反応中に読み誤りを起こし易いとされている<sup>42)</sup>。TMV L系統では、最初に得られた全長cDNAクローンのin vitro転写産物をタバコに接種したところ感染性がなかった。そこで、in vitro翻訳実験によって調べた結果、少なくとも130K蛋白質遺伝子に突然変異があることが示唆された<sup>79)</sup>。本実験で1aおよび2a蛋白質遺伝子領域を含むcDNAをクローニングする際にも同様の実験を行ったところ、1a蛋白質遺伝子のcDNAクローンの方で2クローンの内1クローンにおいて全長蛋白質の合成が認められなかった。この原因としては、このクローンが1a蛋白質の開始コドンまでを含んでいなかったこと、および翻訳領域内に突然変異が起こり正常な蛋白質が翻訳されなかったことが考えられた。

BMVでは、ウイルス感染オオムギ葉からBMV RNA複製酵素がすでに部分純化されている<sup>74, 82, 98)</sup>。Hallらは、BMV RNA3の3'端200塩基に対するcDNAから転写ベクターを用いてその領域のRNA断片を調製する系を作製し、種々の変異を導入されたRNA断片とBMV RNA複製酵素との親和性を調べることで本酵素の鋳型としての活性に関与する領域の同定を試みた<sup>19, 28, 32, 33, 84)</sup>。この系では、RNA断片の3'端に野性型のウイルスRNAの3'端と全く同一の配列をもたせるために、ウイルス配列の3'端に制限酵素Tth111 Iの認識部位を導入した。すなわち、Tth111 Iで切断した後、転写反応を行わせることにより、切断された末端で転写が停止し、3'端がウイルス配列と同じCCAでおわるRNA断片を得ることができる。BMV ATCC66系統においてもRNA1、RNA2およびRNA3の3'端数百塩基のcDNAを作製し得られたRNA断片を、BMV RNA複製翻訳酵素の系に加えた結果、全てのRNA断片が酵素の鋳型としての活性を示し、反応産物である二本鎖RNAの合成が認められた<sup>74)</sup>。

BMV Russian系統では、全長cDNAを含む転写ベクター中のウイルス配列の3'端の近傍にEcoR I部位が導入されている<sup>8)</sup>。これは、Tth111 I部位が全ての全長cDNA

クローンの内部に存在するのに対して、EcoR I 部位が内部に全く存在しないことによると考えられる。その結果、EcoR I で切断し、得られた転写産物の3'端には、6〜7塩基の非ウイルス配列が付加されるが、このような余分な配列はRNAの感染性に影響を及ぼさないことが分かっている。そこで、本実験でもRussian系統と全く同様の配列がウイルス配列の後ろに付加されるようにデザインし、pBBシリーズベクターおよび転写ベクターを作製した。

Russian系統では、RNA3の5'端に種々の長さの非ウイルス配列を付加し、それが、RNAの感染性に及ぼす影響が調べられている。その結果、1塩基の付加は、植物体レベルでは全く影響がなく、プロトプラストレベルでも3分の1に減少したのみであったのに対して、7塩基付加したものでは、いずれの系においても感染性が全くみられなかった<sup>57)</sup>。そこで、本実験では5'端に余分な塩基が全く付加されないような転写ベクターを作製することを試みた。BMV RNAは、すべて5'端が[GUA]という配列で始まっている。一方、制限酵素SnaB Iは認識配列が[TACGTA]であり、中央のCとGの間で切断されることによって平滑末端を生じる。したがって、全長cDNAの5'端にSnaB I 部位を導入しクローニングしておく、のちに本酵素で切断することによって平滑末端をウイルス配列の5'端とすることができる。このようにして作製したのがpBBシリーズベクターであり、このベクターをSnaB I とEcoR I で切断することによって各RNAに対する全長cDNAを切り出すことができ、種々のベクターに導入し直すことができる。また、pBBシリーズベクターは、BMVプラス鎖配列の3'端の下流、すなわちマイナス鎖配列の5'端の上流にSP6プロモーター配列があるので、DNAをSnaB I で切断した後、SP6ポリメラーゼを加えることによって3'端の正確なマイナス鎖RNAを*in vitro*で合成することができる。

最近、CMV Q系統において PCR (Polymerase chain reaction) を利用して全長cDNAがクローニングされた<sup>47)</sup>。上述のように、BMV ATCC66系統において全長cDNAを合成する際にいくつかのcDNA断片を繋ぎ合わす方法を用いたのは、一段階で全長cDNAが容易に合成されなかったことによる。その際、得られたcDNAがすべて3'端領域を含んでいたことから、長いcDNAが合成されなかった原因は第一鎖合成にあると考えられた。しかしPCR法では、cDNA合成において第一鎖合成がごく微

量であっても、全長cDNAが一分子でも合成されておれば、その後のポリメラーゼ反応の連鎖反応によってin vitroで全長cDNAの増幅が可能であり、特別に熟練した技術を持たなくても容易に全長cDNAのクローニングが可能となる。確かにこの方法は、高温においても活性を失わないDNA依存DNAポリメラーゼを用いることによって飛躍的に反応効率が上がったが、本酵素の複製の誤りの頻度や種類に関してはまだ詳細には分かっておらず今後の研究に待たねばならない。しかし、今回CMV Q系統において合成された全長cDNAのin vitro転写産物が感染性を持っていた<sup>47)</sup>ことから、この技術は、今後さらに一般的なものになっていくものと考えられる。

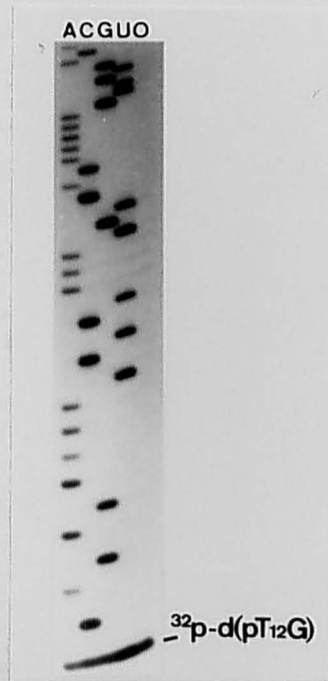


図 4. BMV(ATCC66系統)のRNA4の3' 端の塩基配列分析を示す20%ポリアクリルアミドシーケンスゲルのオートラジオグラム

$^{32}\text{P}$ -d(pT<sub>12</sub>G)をプライマーとし、ddTTP(レーンA)、ddGTP(レーンC)、ddCTP(レーンG)、ddATP(レーンU)およびddNTPなし(レーンO)存在下で、分画したRNA4を鋳型に用いて逆転写酵素によってcDNA合成を行った。



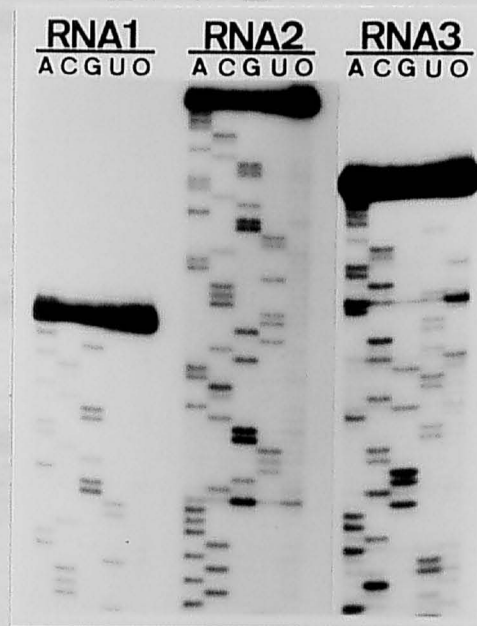


図5. BMV(ATCC66系統)のゲノムRNAの5'端の塩基配列分析を示す7.5%ポリアクリルアミドシーケンスゲルのオートラジオグラム  
RNA1の塩基番号75~89、RNA2の塩基番号104~118およびRNA3の塩基番号92~106に相補的なデオキシオリゴヌクレオチドの5'端を $^{32}\text{P}$ でラベルしたものをプライマーとして用い未分画のウイルスRNAを鋳型に用いて図4と同様にcDNA合成を行った。

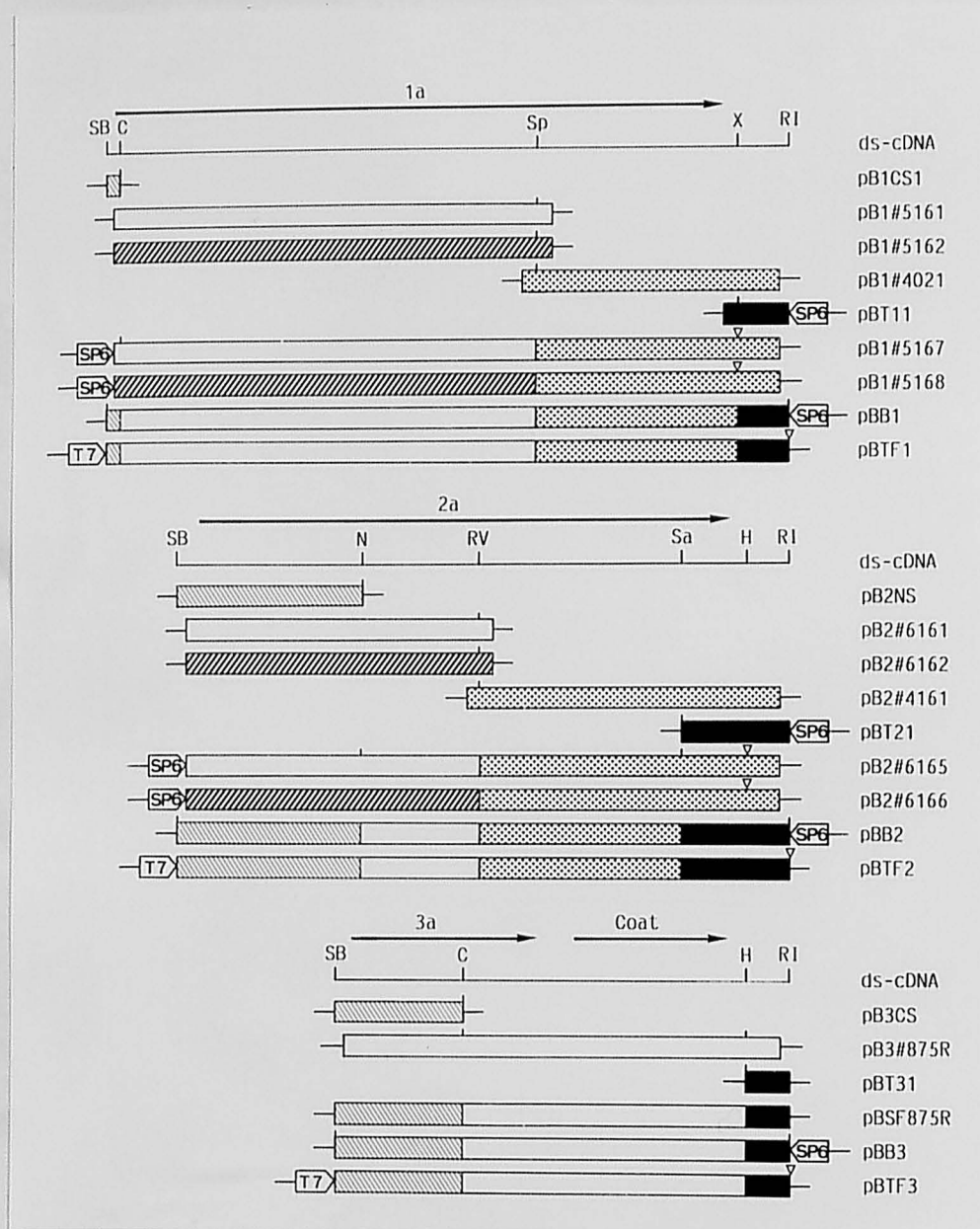


図6. BMVのゲノム構成と各プラスミドにクローニングされた二本鎖cDNAの模式図  
 BMVの4種の蛋白質のシストロンは二本鎖cDNAの制限酵素地図上に示した。  
 RNA1、2および3それぞれのcDNAで同じ影で示したものは由来が同一であることを示す。pBBまたはpBTFプラスミドの構築に用いた制限酵素部位のみをcDNA上に|で示した。▽はrun-off転写の際に切断する制限酵素部位を示す。  
 SP6: SP6プロモーター、T7: T7プロモーター、1a: 1a蛋白質、2a: 2a蛋白質、3a: 3a蛋白質、Coat: 外被蛋白質、SB: SnaB I、C: Cla I、Sp: Sph I、X: Xba I、RI: EcoR I、N: Nco I、RV: EcoRV、Sa: Sac I、H: HindIII

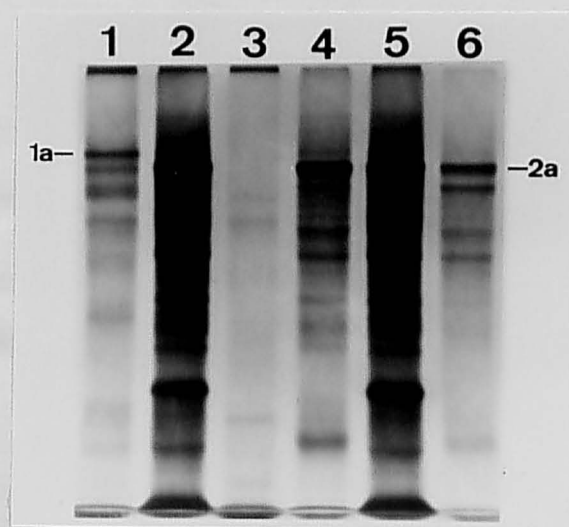


図7. BMVの1aおよび2a遺伝子に対するcDNAのin vitro転写産物から合成されたin vitro翻訳産物のフルオログラフ

[ $^{35}\text{S}$ ]-メチオニンを基質とし、pB1#5167(レーン1)、pB1#5168(レーン3)、pB2#6165(レーン4)およびpB2#6166(レーン6)の転写産物とBMV RNA(レーン2、5)を用い、ウサギ網状赤血球ライセートでin vitro翻訳を行った。SDS-10% PAGEの後、ENLIGHTENING<sup>TM</sup>で処理し、フルオログラフィーを行った。1a: 1a蛋白質、2a: 2a蛋白質



図8. BMVのRNA複製酵素(DEAE酵素)<sup>74)</sup>による *in vitro* 反応産物のオートラジオグラム

pBSP104(レーン1)、pBSP204(レーン2)およびpBSP304(レーン3)の *in vitro* 転写産物を鋳型として用いRNA合成した後、1% アガロースゲル電気泳動の後、オートラジオグラフィーを行った。右側の数字は、BMV RNAの各複製型二本鎖RNA(RF)の泳動位置を示す。

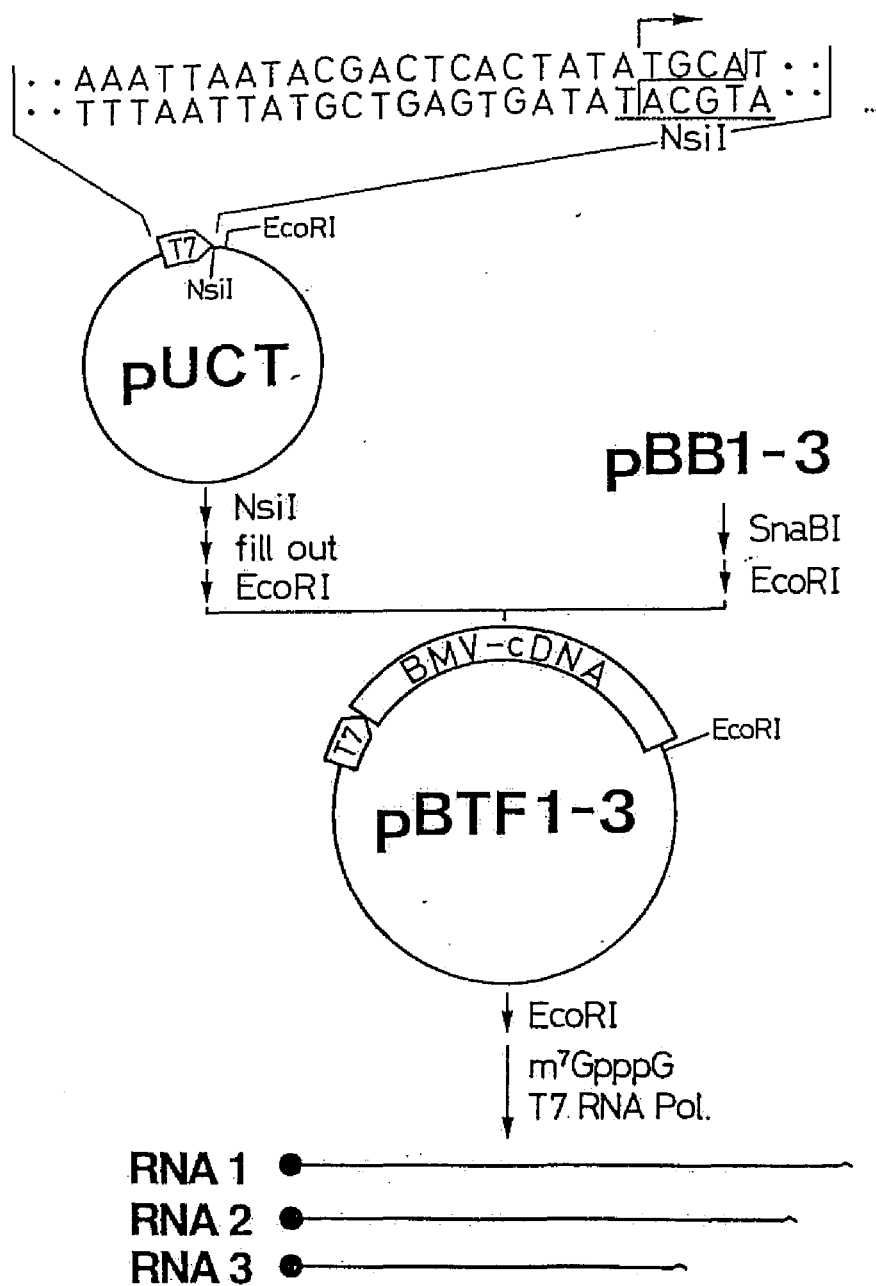


図9. BMV RNAの全長cDNAの転写ベクター(pUCT)への挿入と  
T7 RNAポリメラーゼを用いたin vitro BMV RNA合成の模式図  
T7: T7プロモーター、T: 転写開始点および転写方向、  
m<sup>7</sup>GpppG: キャップアナログ、●: キャップ構造、  
へ: BMV RNAの3'端に付加される余分な塩基

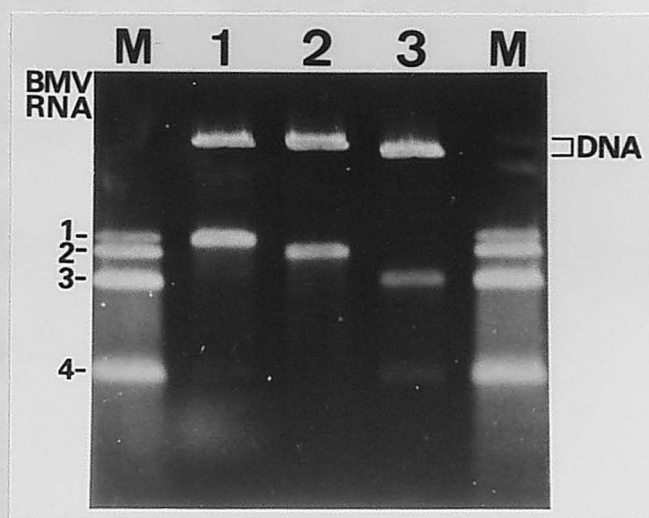


図10. *In vitro*で転写されたBMV RNAのアガロースゲル電気泳動による分析

*EcoR* I で処理したpBTF1(レーン1)、pBTF2(レーン2)およびpBTF3(レーン3)を鋳型として用い、転写反応を行った。

レーンM: ウイルス粒子から抽出されたBMV RNA.





図11. BMV RNAの全長cDNAのin vitro転写産物接種14日後のオオムギ葉  
図10と同様の方法で得られたin vitro転写産物をカーボランダム  
と混合し、オオムギ(cv.五畝四石)の第一葉に接種した。

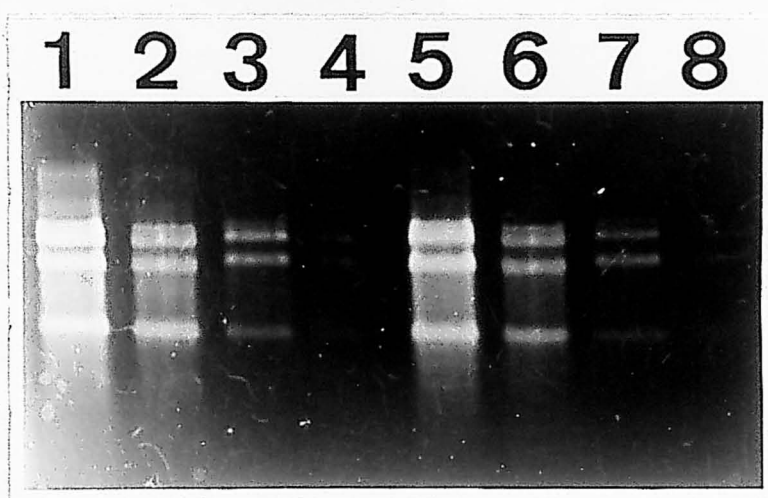


図12. BMV RNAの全長cDNAのin vitro転写産物を接種したオオムギ葉から調製したウイルス粒子中のRNAのアガロースゲル電気泳動による分析

レーン1～4: BMV RNAの接種、レーン5～8: in vitro転写産物の接種  
レーン1から4、またレーン5から8は1/3倍の段階希釈を行った。



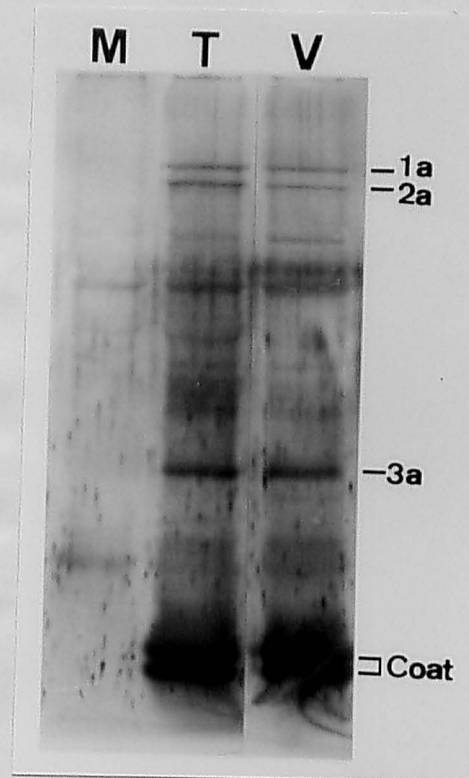


図13. BMV RNAの全長cDNAの*in vitro*転写産物を接種したオオムギプロトプラストにおけるウイルス蛋白質のウェスタンブロッティング法による分析  
 検出には1a、2a、3a蛋白質およびBMVに対する抗体を混合して用いた。  
 レーンM: モック接種、T: *in vitro*転写産物接種、V: BMV RNA接種  
 1a: 1a蛋白質、2a: 2a蛋白質、3a: 3a蛋白質、Coat: 外被蛋白質



図14. In vitro転写産物接種4日後のChenopodium hybridum  
の接種葉にみられた局部病斑

図10と同様のin vitro転写産物を用いて接種した。

付表1. 大腸菌(*E. coli*)の培養および保存用培地組成

成 分	LB培地 <sup>a)</sup>	LM培地 <sup>a)</sup>	SOB培地 <sup>b)</sup>
Bacto-tryptone	10g	10g	1.0g
Bacto-yeast extract	5g	5g	0.25g
NaCl	10g	0.58g	29mg
KCl	-	-	9mg
LM用Mg <sup>c)</sup>	-	10ml	-
SOB用Mg <sup>d)</sup>	-	-	0.5ml
イオン交換水	1000ml	1000ml	-
超純水	-	-	50ml

a) 寒天平面培地の作製には1.5%(w/v)になるように精製寒天末(ナカライテスク社)を加え、オートクレーブする。

b) フィルター(MILLEX-GS, 0.22  $\mu$ m, MILLIPORE社)滅菌する。

c) 1M MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O オートクレーブ後に加える。

d) 1M MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O/1M MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O

付表2. M9-グルコース培地の組成

ストック液 <sup>a)</sup>	液体培地 <sup>b)</sup>	寒天平面培地 <sup>c)</sup>
イオン交換水	2550 $\mu$ l	170ml
精製寒天末	-	3g
10×M9 溶液 <sup>d)</sup>	300 $\mu$ l	20ml
0.1M $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	30 $\mu$ l	2ml
10mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	30 $\mu$ l	2ml
20%(w/v)グルコース	60 $\mu$ l	4ml
0.01%(w/v)チアミン塩酸	30 $\mu$ l	2ml

a) ストック液は全てフィルター(付表1脚注参照)滅菌する。

b) イオン交換水だけ培養チューブ中でオートクレーブ滅菌しておく。

c) イオン交換水と精製寒天末のみをオートクレーブしていき、50℃以下になってからストック液を加える。

d) イオン交換水100ml当り17.6gの $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、3gの $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、0.5gの $\text{NaCl}$ および1gの $\text{NH}_4\text{Cl}$ を含む。

#### 第IV章. BMV ATCC66系統の全ゲノムRNAの塩基配列の決定とBMV Russian系統との比較

RNAの塩基配列決定法には、直接RNAを部分分解する方法、RNAを鋳型にジデオキシヌクレオチド存在下で逆転写酵素を用いてRNAからcDNAを合成する方法およびクローニングされたcDNAの塩基配列を決定する方法がある。第1の方法は、末端塩基を $^{32}\text{P}$ で標識した後、酵素的<sup>31)</sup>、または化学的<sup>92)</sup>に塩基特異的な部分分解を行い直接RNAの塩基配列を決定する方法であり、ウイルスRNA、rRNAあるいはtRNAなどで、それらの塩基配列が決定されている。また、第2の方法は、RNAに相補的な合成プライマーを用い、ジデオキシNTP存在下でRNAを逆転写して、直接RNAの塩基配列を決定する方法<sup>27, 78)</sup>である。これらの方法は、目的のRNAの塩基配列を集団全体として捉えることができ、もとのRNA集団の塩基配列の多様性などを正確に知ることができる。しかし、操作が煩雑で多大の労力と時間を要するため、例えば数千塩基に至るようなウイルスRNAの全塩基配列の決定にはあまり用いられなかった。一方、mRNAのように、微量で分離精製することが容易でない場合には、第3の方法が用いられる。すなわち、RNAからcDNAを合成し、さらにこれを二本鎖にしてクローニングし、通常のDNA塩基配列決定法で決定する。

植物RNAウイルスのゲノムの大きさは、大部分のものが6,000塩基以上であり、10,000塩基を越えるものもある。現在まで知られている植物RNAウイルスでゲノムサイズが最も小さいTurnip crinkle virus<sup>22)</sup>のグループにおいても約4,000塩基である。このような高分子RNAの塩基配列を決定する場合は、上述のcDNAクローニングを利用する方法が最も簡便であり、1982年のTMV<sup>40)</sup>以来、数多くの植物RNAウイルスで報告されてきた塩基配列のデータは、全てこの方法を利用して得られたものである。しかし、このようなcDNAクローニングを用いる方法には、第III章で述べたように塩基配列を誤る危険性がある。Cucumber mosaic virus Q系統ではRNA3にコードされた外被蛋白質遺伝子のC端付近で判読ミスによって一塩基欠落したためにそれ以降frame shift変異が起こり、間違ったアミノ酸配列が報告された<sup>24, 43)</sup>。TMVの普通系統においては、当初ゲノムRNAの5'端領域は、2種類のRNA配

列を持ち、多型を示すと報告された<sup>48)</sup>。その後、Meshiらによって、普通系統で多型がみられた原因は、普通系統試料にTMVトマト系統が混入したためであるとの指摘がなされた<sup>78)</sup>が、このように誤って報告されたのもcDNAクローニングを利用したためであると考えられる。

前章で述べたようにBMV ATCC66系統ではすでに、オオムギに感染性を示すRNAを転写し得るような全長cDNAがクローニングされている。したがって、これらのcDNAクローンの全塩基配列を決定することによって全ゲノムRNAの正確な塩基配列を決定できる。しかし、非翻訳領域の塩基配列には、cDNAのクローニング中に起こった多少の変異は蓄積され得ると考えられたので、とくに大きな変異のみられた3領域については、ジデオキシ法によって逆転写酵素を利用して直接RNAの塩基配列を決定した。さらに、本研究で得られた塩基配列をすでに塩基配列の決定しているBMV Russian系統<sup>3, 4)</sup>をはじめとするいくつかの近縁植物RNAウイルスの配列と比較した。

## 材料と方法

### 1. DNAのシーケンシング

一本鎖DNAの調製には、phagemid-ヘルパーファージの系を用いた。宿主菌としてE. coli MV1184株、phagemidにpUC118、pUC119、またヘルパーファージとしてM13 KO7を用いた<sup>122)</sup>。BMV RNAの全長cDNAクローンを種々の制限酵素で切断し、pUC118、pUC119の適当な制限酵素部位に挿入した後、MV1184株に導入し、それにM13 KO7を感染させることによって目的のDNA配列を含む一本鎖DNAを調製した。2〜3  $\mu$ gの一本鎖DNAを用い、市販のキット(7-deaza Sequenase<sup>TM</sup> Version 2.0 for labeled dCTP, United States Biochemical社)を用いてシーケンス反応を行った<sup>139)</sup>。ラベリングには $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ (比活性 >400 Ci/mmol、Amersham社)を用いた。最終反応産物は-20°Cで保存し、3日以内に電気泳動に供した。プライマ

一から300塩基以上シーケンスする場合には90 cmゲルを、それ以外の場合には60 cmゲルを使用し、RNAシーケンシング(第III章参照)と同様に電気泳動およびオートラジオグラフィーを行った。

## 2. DNA塩基配列の解析

塩基配列の解析には、SDC-GENETYX遺伝情報処理ソフトウェア(Ver 6.04、ソフトウェア開発株式会社)を用いた。BMV Russian株のRNA3の塩基配列はデータベースのものを利用し、Russian株のRNA1とRNA2の塩基配列および本実験で決定されたBMV ATCC66株の全塩基配列は、[EDIT]コマンドによって入力した。

## 結 果

### 1. BMV ATCC66系統のゲノムRNAの塩基配列の決定

プラスミドpBTF1、pBTF2およびpBTF3は、それぞれBMV ATCC66系統のRNA1、RNA2およびRNA3の完全長のcDNAを含む。これらのcDNAクローンから得られたin vitro転写産物の混合物は、オオムギのプロトプラスト、植物体あるいは局部病斑植物であるC. hybridumに感染し、その感染性、子孫ウイルスRNAおよびウイルス蛋白質はウイルス粒子RNAを接種した場合と全く同一であった。そこでBMV ATCC66系統の全ゲノムRNAの塩基配列を決定するため、pBTF1、pBTF2およびpBTF3に含まれるcDNAの塩基配列を決定した。BMV Russian系統の塩基配列データ<sup>3,4)</sup>から作製した制限酵素地図を参考にして各プラスミドを種々の制限酵素で切断した後、pUC118またはpUC119にサブクローニングした後、1本鎖DNAを調製し、塩基配列を決定した(図15)。その結果、pBTF1の塩基番号500付近、pBTF2の塩基番号1680と2140付近でオートラジオグラムのバンドの強い縮重がみられたが、正逆両方向のシーケンスを読むこと、あるいは7-deaza dGTPの代わりにdITPを用いることでバンドパ

ターンを解読することができた。pBTF1、pBTF2およびpBTF3から得られた塩基配列のデータをRNAに読み替え、それぞれ図16、図17および図18に示した。またそれらにコードされたポリペプチドのアミノ酸配列も併記した。

## 2. BMVのATCC66系統とRussian系統におけるゲノムRNAの塩基配列とアミノ酸配列の比較

### 1) 塩基配列の比較

#### ①RNA全域の塩基配列の比較

BMV ATCC66系統のRNA1、RNA2およびRNA3の塩基配列をRussian系統のRNAの塩基配列と比較した(図19、20と21)。その結果、RNA1はどちらも3234塩基、RNA2はATCC66系統では2a蛋白質の翻訳領域のすぐ下流に(AU)配列が付加されているため2塩基多い2867塩基であった。さらに、RNA3はintercistronic領域に存在する長さがヘテロなポリ(A)配列を除けば、ATCC66系統の方が、RNA4の5'端非翻訳領域の(AA)配列が欠失しているため2塩基少ない2114塩基であった。ホモロジーは、RNA1、RNA2およびRNA3でそれぞれ98.9%、97.8%および98.7%となり、RNA2で若干低かった。

アミノ酸置換を伴う塩基置換は33ヶ所中31ヶ所がコドンの第1あるいは第2ポジションであり、アミノ酸置換を伴わない塩基置換は69ヶ所中66ヶ所がコドンの第3ポジションでの塩基置換であった。また、全翻訳領域中の102ヶ所の塩基置換の内、コドンの第3ポジションでの塩基置換は68ヶ所(約67%)であった。ATCC66系統の四重縮退コドンの第3ポジションにおける塩基の使用頻度は、プリンよりもピリミジンの方が高かった(表1-A)。transition型の全翻訳領域中の塩基置換に占める割合はtransversion型より多く、その中でも特にピリミジンからピリミジンへの置換がより多かった(表2、図22)。

#### ②5'端非翻訳領域の比較



5'端非翻訳領域については、RNA1とRNA3では両系統の間で完全に保存されていた。RNA2の5'端は3ヶ所の塩基置換以外にRNAの組換えが起こったと思われる領域があった(図20、22)。しかし、この変異はcDNAクローニング中に試験管内で起こった可能性とcDNA合成の鋳型に用いたウイルスRNAの内、極めてまれなRNAを鋳型にして合成されたcDNAのものである可能性が考えられたので、未分画のRNAを用いて直接この領域のRNAシーケンシングを行った。プライマーには、RNA2の5'端のRNAシーケンス決定に用いたものと同じプライマーB2を用いた。その結果、cDNAのシーケンシングと同一の結果が得られた(図23)。MarshらがRussian系統のRNA1のマイナス鎖の3'端について提唱した立体構造モデル<sup>77)</sup>を参考にATCC66系統のRNA2のマイナス鎖の3'端についても同様のモデルを作製した(図24)。その結果、RNAの組換えが起こったと思われる領域は大きなループ状構造に含まれていた。Ahluquistらのデータ<sup>2)</sup>を参考に、ATCC66系統内でのRNA間の5'非翻訳領域の塩基配列を比べたところ、とくにRNA1とRNA2で高いホモロジーが認められた(図25)。また、真核型のRNAポリメラーゼIIIが認識するクラスIIIプロモーターのBox Bのコンセンサス配列<sup>126)</sup>とホモロジーの高い領域があった(図25)。

### ③3'端非翻訳領域の比較

BMVをはじめ多くの植物RNAウイルスでは、3'端非翻訳領域の一部がtRNA様構造をとることが知られている<sup>58, 104)</sup>。BMV ATCC66系統でもRussian系統と同様にtRNA様構造およびその上流のステム(ループ構造<sup>2)</sup>を描くことができた(図26)。これらの領域内にはRNA1、RNA2およびRNA3でそれぞれ3、2および3ヶ所の塩基置換が認められたが、それらはいずれも立体構造に大きな影響を及ぼすような変異ではなかった。また、ATCC66系統では2a蛋白質の翻訳領域のすぐ下流に(AU)配列の付加が認められた。そこで未分画のRNAを鋳型とし、B4プライマーを用いて直接この領域のRNA配列を決定した。その結果、cDNAの塩基配列決定によって得られたものと同一の結果が得られた(図23)。

### ④RNA3のintercistronic領域の比較

RNA3の3a蛋白質遺伝子と外被蛋白質遺伝子の間のintercistronic領域を比較したところ、3ヶ所の塩基置換と、ATCC66系統ではRNA4の非翻訳領域に(AA)配列の欠失が認められた(図21、27)。Marshらのデータ<sup>76)</sup>を参考にこの領域のマイナス鎖にあるRNA4転写のためのサブジェノミックプロモーターの二次構造を描いたところ、2ヶ所の塩基置換と(AA)配列の欠失は、そのような構造に重大な影響は与えなかった(図28)。また、未分画のウイルスRNAを鋳型とし、B5プライマーを用いて直接この領域のRNA配列を決定した。B5は、RNA4に加えてRNA3にもハイブリダイズする。したがって、図中の強いストップシグナルはRNA4の5'端を表わし、シグナルより下部はRNA3とRNA4のシーケンスを、上部はRNA3のみの塩基配列を表わす。その結果、ATCC66系統では、ウイルスRNAレベルでも(AA)配列が欠失していることがわかった(図27)。ポリ(A)配列より上部のシーケンスラダーが不明瞭になっているのは、種々の長さのポリ(A)配列をもつRNA3が存在していることを表していると考えられた<sup>3)</sup>。ポリ(A)中のG塩基を表わすバンドは少なくとも3バンド認められたが(図27)、この結果からだけでは、G塩基より下流のポリ(A)配列の長さがRNA3の分子間でヘテロなのか、あるいは実際複数個のG塩基をポリ(A)配列中にもつRNA3が存在するのかは分からなかった。

## 2) アミノ酸配列の比較

1a、2a、3aおよび外被蛋白質においてATCC66系統とRussian系統の間でアミノ酸配列を比較した結果、それぞれ11、15、4および3残基のアミノ酸が置換していた(図22)。置換されたアミノ酸間の性質の違いを遺伝子地図上にマッピングした(図29)。その結果、多くのRNAウイルス間でホモロジーの高い1a蛋白質遺伝子内の2つの保存領域、2a蛋白質遺伝子内の1つの保存領域<sup>8, 41, 46, 59)</sup>にみられた置換アミノ酸の性質の違いはそれほど高くなかった。1aおよび外被蛋白質のN端と2a蛋白質のC端にとくにアミノ酸置換が集中していた。1a蛋白質のC端側の保存領域には、大腸菌のATP依存ヘリカーゼとホモロジーが高く、いくつかのウイルスにコードされた蛋白質のアミノ酸配列の間で保存されている6ヶ所のモチーフ<sup>50)</sup>がある。ま

た、同様に2a蛋白質の保存領域にも多くのRNA依存ポリメラーゼのアミノ酸配列の  
間で保存されている4ヶ所のモチーフ<sup>96)</sup>がある。これらのモチーフにおけるアミ  
ノ酸置換をBMVの2系統間で調べたところ、置換は全くみられなかった。3a蛋白質  
でみられたアミノ酸置換は、類似の性質を持つアミノ酸間の置換であったが、中  
央に比較的性質の異なるHisとAspの間での置換が認められた<sup>86)</sup>。BMV Russian系  
統ではすでに3a蛋白質のアミノ酸配列をCCMVとCMVの3a蛋白質と比較し、ある程度  
のホモロジーが認められている<sup>18)</sup>が、そのなかに唯一BMVがCCMVと3アミノ酸残基  
のギャップを持つ領域がある。BMVの2系統間でみられたHisとAspの置換はその領  
域で起こっていた(図30)。外被蛋白質は、N端に塩基性のアミノ酸が集中しており、  
このような領域がウイルスの粒子形成に重要であることが報告されている<sup>106)</sup>。  
この領域にもアミノ酸置換が認められたが、それはHisとArgの間のものであり、  
塩基性は保存されていた。

## 考 察

BMV ATCC66系統の塩基配列をRussian系統の塩基配列と翻訳領域において比較し  
た結果、コドンの第3ポジションでの塩基置換が67%と高かった。これは、コドン  
表あるいは本実験における両系統の比較からも明らかなように、第3ポジションで  
の塩基置換の多くがアミノ酸置換を伴わないため淘汰を受けにくく、変異が蓄積  
していったためと考えられる。また、全コドンの約半数を占める四重縮退コドン  
に代表されるように、ATCC66系統の全コドンの第3ポジションにはピリミジンが多  
く(表1-A)、これはRussian系統と同様であった<sup>4)</sup>。全翻訳領域における塩基組成  
には特別な偏りが無かったことから(表1-B)、なぜコドンの第3ポジションにのみ  
ピリミジンの偏りがみられたのかは分からない。さらに、全塩基置換に占めるピ  
リミジンからピリミジンへの置換の割合が多かった(表2)のは、塩基置換率の高い  
第3ポジションにピリミジンが偏っていたことを反映しているのかもしれない。

Marshらは、Russian系統のRNA1のマイナス鎖の3'端領域についてtRNA<sup>Met</sup>と同

様の構造モデルを提唱した<sup>77)</sup>。全ゲノムRNAについて、ATCC66系統とRussian系統の5'端非翻訳領域を比較したところRNA2のみで変異がみられた。そこで、RNA2のマイナス鎖においてもRNA1のマイナス鎖と同様の立体構造モデルを作製することで立体構造と変異の関係を調べた。RNA1とRNA2の5'端非翻訳領域配列の中で、とくに5'端約40塩基については極めて高い相同性がみられ、その領域のマイナス鎖はMarshらと同様のステムループ構造をとることができた。また、RNA2のマイナス鎖の3'端から59番目から90番目までの塩基が大きなループ状構造をとることができた(図24)。このループの中にはとくにAの多い繰り返し配列が存在しており、両系統の比較で認められた大きな変異もこの構造の中にあった。DNAの組換え現象に比べ、RNAの組換えについては未知の部分が多く、現在は現象の有無を論議する段階からそのメカニズムについての研究が始まったばかりである<sup>12,28,181)</sup>。したがって、この領域にみられたような大きな変異がRNAの組換えによるものかどうかは、この領域がどのような生物活性をもっているかも含めて今後の研究課題であろう。

真核生物のtRNAは、RNAポリメラーゼIIIによって転写される。mRNA合成に参与するRNAポリメラーゼIIが転写開始点の上流のTATA BOX配列やCCAAT BOX配列を認識するのに対して、RNAポリメラーゼIIは転写開始点の下流すなわちtRNA遺伝子の内部に存在する2つのコンセンサス配列を認識する。その中でもICR2とよばれる領域(Box Bともいう)が特に重要で、この領域は同時にtRNAのTψCループ部分でもある<sup>126)</sup>。HallらのグループはこのICR2と相同性を持つ領域が多くの植物RNAウイルスの末端配列中に存在することを見出し<sup>77)</sup>、さらにそこに点突然変異を導入したBMV RNA2を作製することによって、この領域がプラス鎖RNAの合成に重要であることを示した<sup>97)</sup>。ATCC66系統においてもこの領域は完全に保存されており(図25)、またRNA2のマイナス鎖の立体構造中においてもTψCループ様の構造は完全に保存されていた(図24)。

ATCC66系統では、RNA2の2a蛋白質遺伝子のすぐ下流に(AU)配列が付加されており、RNA3の外被蛋白質遺伝子のすぐ上流では(AA)配列が欠失していた。いずれもその生成の機構は明きらかではないが、両方に共通していることは、2領域とも非

翻訳領域にあり、変異が起こった周囲の配列はAとUが多く、数塩基にわたって逆位反復配列をとり得るということであった。また、RNA3では(AA)配列が欠失することによって外被蛋白質の翻訳開始コドンの周辺のKozak Box<sup>65)</sup>がコンセンサス配列とは異なり、開始コドンの3塩基上流がAからUに変わっていた(図25)。

外被蛋白質のmRNAであるRNA4は感染過程でRNA3から合成されると考えられてきたがその生成機構は不明であった。Millerら<sup>83)</sup>は、RNA3のマイナス鎖からBMV RNA複製酵素によってプラス鎖のRNA4が合成されることを初めて示し、さらにMarshら<sup>76)</sup>は欠失変異体を用いた実験からRNA4すなわちサブゲノムRNAの合成に必要なプロモーター配列を同定し、その領域の二次構造モデルを提出した。ATCC66系統においても同様の二次構造モデルを作製した(図24)。その結果、RNA4の5'端非翻訳領域の(AA)配列の欠失は、ループの大きさを2塩基分だけ短くするだけで全体の構造には影響がなかった。また、ポリ(A)配列中に見いだされたGすなわちマイナス鎖でいえばポリ(U)配列中のCはモデルで大きなループに含まれる部分の変異であるためこれも全体の構造には影響がなかった。前者のループ構造は、サブゲノムRNAの正確な合成開始に重要であると指摘されている<sup>76)</sup>が、ATCC66系統では、この領域から(AA)配列が欠失していたことから、このことについては次章でさらに検討した。また、後者の大きなループ構造中のポリ(U)配列はin vitroでの実験からその前後に存在するコア配列の距離を保つスペーサーとしての働きが指摘されている<sup>76)</sup>ことから、ATCC66系統でもその部位へのCの挿入は起こり得ることであると考えられた。ATCC66系統のRNA4転写プロモーター領域の二次構造モデルの中央部にある[CAGAAUU]配列はRussian系統では[CAGGAUU]となっており、動物ウイルスのアルファウイルスのサブゲノムRNAプロモーターと完全に一致している<sup>76)</sup>。また次章で他の3系統のBMVの配列でもこの7塩基はRussian系統と全く同一であった(図43)。ATCC66系統のみで4番目の塩基がGからAになっていたことは、進化学的にもまた生物学的にも興味ある問題である。

2a蛋白質のアミノ酸配列の変異がC端で集中してみられたことは、この領域のペプチドがBMV RNAの複製に必要でないとするデータ(Ahlquist, P: 私信)と矛盾しないものであった。2a蛋白質のC端において置換がみられたアミノ酸よりもさらに

性質の異なるアミノ酸間の置換が1a蛋白質のN端でみられた。この領域は、多くのRNAウイルス間で保存されている領域でないことから、このペプチド領域がBMVの生物活性において果たす役割は小さいかもしれない。

本章では、生物活性をもつRNAを転写できる全長cDNAの塩基配列を決定することによって、BMV ATCC66系統の全ゲノムRNAの塩基配列を決定した。このようにまず生物活性を確認した後、その全長cDNAの塩基配列を決定する方法が用いられたものには、他にCCMV<sup>9)</sup> およびTurnip crinkle virus<sup>22)</sup> がある。本章の始めに述べたようにcDNAクローニングにはいくつかの注意すべき点がある。したがって、これから新規のウイルスの塩基配列を決定する場合、まず生物活性を確実に調べた後、そのcDNAの塩基配列を決定することが重要であろう。

表1-A. BMV-ATCC66系統の遺伝子中の四重縮退  
コドンにおける第3ポジションの塩基の選択性

遺伝子	第3ポジションの塩基の割合			
	G	A	U	C
1a	0.21	0.17	0.38	0.24
2a	0.16	0.19	0.41	0.24
3a	0.17	0.19	0.41	0.24
coat	0.23	0.18	0.35	0.24
合計	0.19	0.18	0.39	0.24

表1-B. BMV-ATCC66系統の遺伝子中の塩基組成

遺伝子	第3ポジションの塩基の割合			
	G	A	U	C
1a	0.26	0.26	0.27	0.21
2a	0.24	0.27	0.28	0.21
3a	0.25	0.25	0.27	0.23
coat	0.29	0.23	0.24	0.24
合計	0.25	0.26	0.27	0.21

表2. BMV-ATCC66系統とRussian系統の全翻訳領域中  
の全塩基置換に占める各塩基置換の割合

Russian系統	ATCC66系統				合計
	G	A	U	C	
G	—	0.17	0.05	0.02	0.24
A	0.14	—	0.05	0.05	0.24
U	0.01	0.03	—	0.28	0.31
C	0.00	0.02	0.20	—	0.22
合計	0.15	0.22	0.29	0.34	—



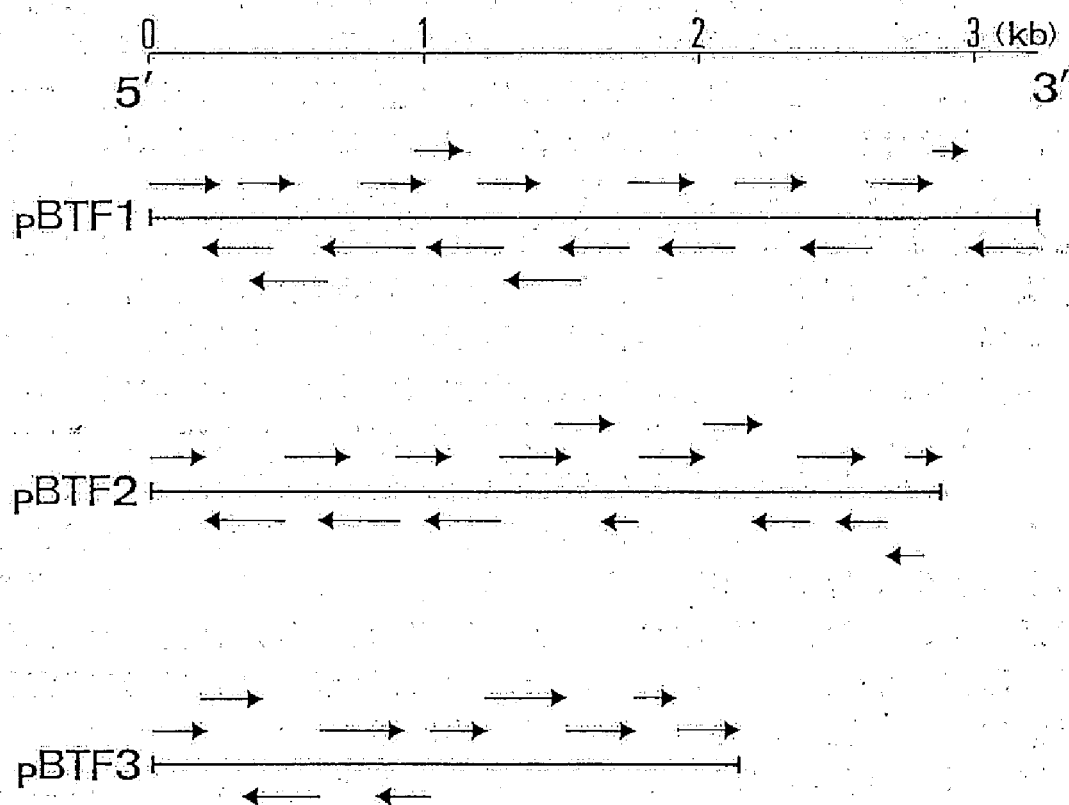


図15. BMV RNA1、2および3に対する完全長cDNAクローンpBTF1、pBTF2およびpBTF3のcDNA領域の塩基配列決定に用いた戦略  
矢印は、塩基配列決定の方向と範囲を示す

m7GpppGAGACCGACGGAACGAGGUUCAAUCCUUGUCGACCCGCUUUGUACUUGUUCUUGUUUUUUACCAACAAA

75 AUG UCA ACU UCU AUC GAU UUG CUG AAG UUG AUU UCU GAG AAG GGU GCU GCC AGC CAG AGU GCC CUA GAC AUC GUA GAC AAU CAG GUC GCG  
Met Ser Ser Ser Ile Asp Leu Leu Lys Leu Ile Ser Glu Lys Gly Ala Ala Ser Gln Ser Ala Leu Asp Ile Val Asp Asn Gln Val Ala

165 CAA CAG UUA UCU GCG CAG AUC GAA UAC GCG AAA AGG UCU AAG AAA AUC AAC GUU CCG AAU AAG CUC UCU AUU GAG GAG GCU GAC GGC UUC  
Gln Gln Leu Ser Ala Gln Ile Glu Tyr Ala Lys Arg Ser Lys Lys Ile Asn Val Arg Asn Lys Leu Ser Ile Glu Glu Ala Asp Ala Phe

255 CGU GAC CGU UAU GGU GGU GCC UUC GAU UUA AAU UUG ACU CAG CAG UAU CAU GCA CCC CAU AGC CUG GCU GGU GCU CUG GGU GUA CCG GAG  
Arg Asp Arg Tyr Gly Gly Ala Phe Asp Leu Asn Leu Thr Gln Gln Tyr His Ala Pro His Ser Leu Ala Gly Ala Leu Arg Val Ala Glu

345 CAU UAC GAC UGU CUC GAC AGU UUU CCC CCU GAA GAC CCC GUU AUA GAU UUC CGA GCG UCU UGG UGG CAU CAC UUU UCA AGA AGG GAU AAA  
His Tyr Asp Cys Leu Asp Ser Phe Pro Pro Glu Asp Pro Val Ile Asp Phe Gly Gly Ser Trp Trp His His Phe Ser Arg Arg Asp Lys

435 AGG GUG CAC AGU UGU UGU CCU GUG UUG GGU GUU AGA GAC GCU GCC CGA CAC GAG GAG AGC AUG UGC CCG AUG CCG AAA AUU UUG CAA GAA  
Arg Val His Ser Cys Cys Pro Val Leu Gly Val Arg Asp Ala Ala Arg His Glu Glu Arg Met Cys Arg Met Arg Lys Ile Leu Gln Glu

525 AGC GAU GAU UUC GAU GAG GUC CCG AAC UUU UGU CUU AAC CGA GCU CAA GAU UGU GAU GUC CAA GCU GAU UGG GCU AUC UGU AUC CAU GGC  
Ser Asp Asp Phe Asp Glu Val Pro Asn Phe Cys Leu Asn Arg Ala Lys Asp Cys Asp Val Gln Ala Asp Trp Ala Ile Cys Ile His Gly

615 GGU UAU GAU AUG GGC UUC CAA GGU CUG UGU GAC GCC AUG CAU UCG CAU GGA GUA CCG GUA CUA CGU GGU ACC GUU AUG UUC GAC GGC GCC  
Gly Tyr Asp Met Gly Phe Gln Gly Leu Cys Asp Ala Met His Ser His Gly Val Arg Val Leu Arg Gly Thr Val Met Phe Asp Gly Ala

705 AUG UUG UUU GAC CCG GAG GGU UUU CUU CCC UUG CUU AAA UGU CAC UGS CAA CGU GAC GGG UCA GGC GCG GAU GAG GUG AUC AAA UUC GAC  
Met Leu Phe Asp Arg Glu Gly Phe Leu Pro Leu Leu Lys Cys His Trp Gln Arg Asp Gly Ser Gly Ala Asp Glu Val Ile Lys Phe Asp

795 UUU GAA AAU GAA AGC ACA UUA UCU UAC AUC CAC GGA UCG CAA GAA UUG GGC UCC UUU UUC ACC GAG UCG GUG CAU UAG AUU GGA ACC  
Phe Glu Asn Glu Ser Thr Leu Ser Tyr Ile His Gly Trp Gln Asp Leu Gly Ser Phe Phe Thr Glu Ser Val His Cys Ile Asp Gly Thr

885 ACC UAU CUG UUG GAG CCG GAA AUG CUG AAA UGU AAC AUC AUG ACC UAU AAG AUC AUC GCU ACA AAU UUA CCG UGC CCC CCG GAG ACA CUA  
Thr Tyr Leu Leu Glu Arg Glu Met Leu Lys Cys Asn Ile Met Thr Tyr Lys Ile Ile Ala Thr Asn Leu Arg Cys Pro Arg Glu Thr Leu

975 CGU CAC UGU GUA UCG UUU GAA GAC UUA UCU AAG UAC GUG GGA GCU CUA AUA CCU GAA GAC UGG AGU CUC AAU CCG AAA UGU GUG CCG  
Arg His Cys Val Tip Phe Glu Asp Ile Ser Lys Tyr Val Gly Val Ser Ile Pro Glu Asp Trp Ser Leu Asn Arg Trp Lys Cys Val Arg

1065 GUC GCC AAA ACC ACA GUG AGA GAG GUA GAG GAG AUA GCU UUC AGA UGU UUC AAG GAA AAU AAA GAA UGG ACC GAG AAC AUG AAA GCU GUC  
Val Ala Lys Thr Thr Val Arg Glu Val Glu Glu Ile Ala Phe Arg Cys Phe Lys Gln Asn Lys Glu Trp Thr Glu Asn Met Lys Ala Val

1155 GCA UCU AUC UUA UCC GCC AAG UCG UCG ACU GUU AUU AUU AAC GGU CAG GCU AUC AUG GCU GGU GAG CCG UUA GAC AUU GAA GAU UAU CAU  
Ala Ser Ile Leu Ser Ala Lys Ser Ser Thr Val Ile Ile Asn Gly Gln Ala Ile Met Ala Gly Glu Arg Leu Asp Glu Asp Tyr His

1245 CUA GUG GCC UUU GCU UUG ACU UUG AAU CUG UAU CAA AAG UAC GAA AAG CUU ACG GCC CUC CCG GAU GGG AUG GAA UGC AAA GCU UGG UGC  
Leu Val Ala Phe Ala Leu Thr Leu Asn Leu Tyr Gln Lys Tyr Glu Lys Leu Thr Ala Leu Arg Asp Gly Met Glu Trp Lys Gly Trp Cys

1335 CAU CAC UUC AAA AGU AGG UUU UGG UGG GGU GGA GAU UCA UCC AGG GCG AAA GUA GGA UGG CUG AGA ACA UGU GCU AGC AGA UUU CCC CUA  
His His Phe Lys Thr Gly Asp Ser Thr Trp Trp Gly Gly Asp Ser Ser Arg Glu Val Gly Trp Leu Arg Thr Leu Leu Arg Phe Pro Leu

1425 CUA CGU CUG GAU UCU UAU GCG GAC AGU UUU AAG UUU CUG ACU CGU CUC UCA AAC GUU GAA GAA UUU GAG CAA GAU UCU GUA CCA AUA UCA  
Leu Arg Leu Asp Ser Tyr Ala Asp Ser Phe Lys Phe Leu Thr Arg Leu Ser Asn Val Glu Glu Phe Glu Gln Asp Ser Val Pro Ile Ser

1515 CGU UUG AGA ACG UUU UGG ACU GAA GUG GAC UUA UUC GAC CCG CUC GAG CAU GAA GUG CAG ACA GCC AAG ACC AAG CCG UCG AAG AAG AAG  
Arg Leu Arg Thr Thr Glu Val Asp Leu Phe Asp Arg Leu Glu His Asp Arg Leu Glu His Val Gln Thr Ala Lys Thr Lys Arg Ser Lys Lys

1605 GCG AUA GUC CCG CCA GCU GCU GAG AUA CCU CAG GAG GAG UUU CAU GAU GCC CCU GAG AGU UCG AGC CCU GAG UCC GUC AGU GAU GAC GUU  
Ala Ile Val Pro Pro Ala Ala Glu Ile Pro Gln Glu Glu Phe His Asp Ala Pro Glu Ser Ser Ser Pro Glu Ser Val Ser Asp Asp Val

1695 AAA CCG GUG ACU GAU GUG GUG CCG GGU GCU GAG UGU UUU GAG GUA CCA ACC GAC CCU CGU GGC AUA UCU AGA CAC GGA GCC AUG AAG  
Lys Pro Val Thr Asp Val Phe Asp Ala Glu Val Ser Val Glu Val Ser Val Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr

1785 GAA UUU GUG CGU UAU UGU AAG AGA UUA CAU AAC AAC UCC GAG UCU AAU CUU CGU CAC CUA UGG GAC AAU UCC GGC GGU CCG GGA AGU GAG  
Glu Phe Val Arg Tyr Cys Lys Arg Leu His Asn Asn Ser Glu Ser Asn Leu Arg His Leu Trp Asp Ile Ser Gly Gly Arg Gly Ser Glu

1875 AUC GCA AAU AAG AGC AUC UUU GAG ACC UAC CAU CCG AUA GAC GAU AUG GUG AAU GUC CAU UUG GCC AAC GGU AAC UGG UUG UAU CCU AAA  
Ile Ala Asn Lys Thr Phe Glu Thr Tyr His Arg Ile Asp Arg Met Val Asn Val His Leu Ala Asn Gln Gly Asn Thr Leu Tyr Pro Lys

1965 AAA UAC GAU UAC ACC GUU GGA UAU AAU GAG CAU GGU UUA GGU CCG AAG CAC GCA GAU GAA ACG UAC AUU GUU GAA AAA ACA UGU GCA UGC  
Lys Tyr Asp Tyr Thr Val Gly Tyr Asn Glu His Gly Leu Gly Pro Lys His Ala Asp Glu Thr Tyr Ile Val Asp Lys Thr Cys Ala Cys

2055 UCU AAC UUG AGG GAC AUU GCA GAA GCU AGC GCC AAA GUU UCU GUC CCU ACA UGC GAU AUU UCC AUG GUU GAU GGA GUU GCG GGA UGC GGU  
Ser Asn Leu Arg Asp Ile Ala Glu Ala Ser Ala Lys Val Ser Val Pro Thr Cys Asp Ile Ser Met Val Asp Gly Val Ala Gly Cys Glu

2145 AAA ACC ACU GCC AUA AAA GAA GCU UUC CGU AUG GGA GAG GAC CUA AUU GUG ACG GCG AAU CGU AAA UCG GCC GAG GAC GUG AUG GCU  
Lys Thr Thr Ala Ile Lys Asp Ala Phe Arg Met Gly Glu Asp Leu Ile Val Thr Ala Asn Arg Lys Ser Ala Glu Asp Val Arg Met Ala

2235 UUA UUC CCU CAC ACU UUU AAU UCC AAG GUA GCU UUG GAC AUU GUG CCG ACC GCU GAU UCU CCG AUC AUG CAC GGU GUA CCG UCC UGU CAU  
Leu Phe Pro Asp Thr Phe Asn Ser Lys Val Ala Leu Asp Ile Val Arg Thr Ala Asp Ser Ala Ile Met His Gly Val Pro Ser Cys His

2325 AGC CUG CUU GUU GAU GAG GCU GCU UUA CUA CAU UAC GGU CAA CUC CUG GUG GCU GCU CUG UCU AAA UGU UCA CNA GUU CUU GCC UUU  
Arg Leu Leu Val Asp Glu Ala Gly Leu Leu His Tyr Gly Glu Leu Leu Val Val Ala Ala Leu Ser Lys Cys Ser Gln Val Leu Ala Phe

2415 GGG GAC ACA GAG CAG AUU UCG UUC AAG UCU CGU GAC GCG GGU UUU AAA UUG CUC CAC GGU AAU CUG AAA UAU GAU CCG CGU GAC GUU GUU  
Gly Asp Thr Glu Gln Ile Ser Phe Lys Ser Arg Asp Ala Gly Phe Lys Leu Leu His Gly Asn Leu Lys Tyr Asp Arg Arg Asp Val Val

2505 CAC AAG ACU UAC CCG UGU CCG CAA GAU GUU AUC GCU GCU GUU AAU CUG CUG AAG CGU AAA UGC GGU AAU AGC GAC ACG AAG UAU CAA UCC  
His Lys Thr Tyr Arg Cys Pro Gln Asp Val Ile Ala Ala Val Asn Leu Leu Lys Arg Lys Cys Gly Asn Arg Asp Thr Lys Tyr Gln Ser

2595 UGG ACA UCU GAG UCC AAA GUU UCU AGA AGU CUC GCG AAG CGU CGU AUU ACU UCU GUU UUG CAG GUC ACU AUU GAU CCG AAC AGA ACG UAU  
Trp Thr Ser Glu Ser Lys Val Ser Arg Ser Leu Ala Lys Arg Arg Ile Thr Ser Val Leu Gln Val Thr Ile Asp Pro Asn Arg Thr Tyr

2685 CUU ACG AUG ACU CAA GCU GAU AAA GCG GCC CUU CAA ACG AGG GCU AAG GAU UUU CCC GUG AGC AAG GAC UGG AUU GAU GGA CAU AUA AAA  
Leu Thr Met Thr Gln Ala Asp Lys Ala Ala Leu Gln Thr Arg Ala Lys Asp Phe Pro Val Ser Lys Asp Trp Ile Asp Gly His Ile Lys

2775 ACA GUA CAC GAA GCG CAA GGG AUC UCU GUU GAC AAU GUC ACU UUG GUU CCG CUU AAG UCG ACC AAA UGU GAU UUG UUU AAA CAU GAG GAG  
Thr Val His Glu Ala Gln Gly Ile Ser Val Asp Asn Val Thr Leu Val Arg Leu Lys Ser Thr Lys Cys Asp Leu Phe Lys His Glu Glu

2865 UAC UGU UUG GUU GCG UUA ACA CGA CAC AAG AAG UCC UUU GAG UAU UCG UUU AAC GCC GAG CUC GCU GGU GAU UUG AUC UUU AAU UGU GUU  
Tyr Cys Leu Val Ala Leu Thr Arg His Lys Lys Ser Glu Tyr Cys Phe Asn Gly Glu Leu Ala Gly Asp Leu Ile Phe Asn Cys Val

2955 AAG UGA UGC GCU UGU CUC UGU GUG GAG CUC UGC CCG AGG AGC CCG UGU UCC AGU AGA CCG UGU UCC GGU UGU UCC GGU UGU UCC GGU UGU  
Lys \*\*\*

3072 UGACACCGACGACUUAACAAGAGUGUCUAGGCCCUUUGAGAGUUAUCUUCUUCUUCUUCGGAAGAACCCUAGGGGUUUGUGCAUGGUGUAGCAAGUCUUAAGUCCGGU

3191 GCGUACAGUGUUGAAAACACUGUAAUUCUUAAGAGACCA 3234

図16. BMV(ATCC66系統)のRNA1の塩基配列とコードされたアミノ酸の配列





1	CUAGACCACG	GAACGAGGUU	CAAUCCCUUG	UCGACCACGG	UUCUGCUACU	UGUUCUUGU	UUUUCACCAA	CAAAUUGUCA	AGUUCUACUG	AUUUGCUCAA	GUUGAUUUUC	Ser G-- Ala	GAGAAAGGUG
121	Ala CUGCCAGCCA	Leu GAGUGCCCUA	GACAUCGUAG	ACAUCAGGU	CGCGCAACAG	UUAUCUGCGC	AGAUCAAAUA	CGCGAAAAGG	UCUAAAGAAA	UCAAACGUUCG	CAUUAAGCUC	UCUUAUGAGG	
121	Asp A--	Gln A--			U--		U--						
241	AGGUGACGG	CUUCGUGAC	CGUUAUGGUG	GUGCCUUGCA	UUUAAAUUUG	ACUCAGCAGU	AUCAUGGACC	CCAUAAGCCUG	GCUGGUGCUC	UGCGUGUAGC	GGAGCAUUAC	GACUGUCUCG	
241				U--	C--		G--				U--		
361	ACAGUUUCC	CCUGAAGAC	CCCGUUUAG	AUUUCGGAGG	GUCUUGGUGG	CAUCACUUUU	CAAGAAGGGA	UAAAAGGGUG	CACAGUUGUU	GUCCUGUGUU	GGUGUUAGA	GACGUGCCCC	
361													
481	GACACGAGGA	GAGGAUGUGC	CGCAUGCGGA	AAAUUUUGCA	AGAAAACGAU	GAUUUCGAGU	AGGUCCCGAA	CUUUUGUCUU	AACCGAGCUC	AAGAUGUGA	UGUCCAAAGCU	GAUUGGGCUA	
481	U--		A--				A--						
601	UCUGUAUCCA	UGGCGGUUUA	GAUAUGGGCU	UCCAAGGUCU	GUGUGACGCC	AUGCAUUCGC	AUGGAGUACG	CGUACUACGU	GGUACCGUUA	UGUUCGACGG	CGCCAUGUUG	UUUGACCGCG	
601		C--											
721	AGGGUUUUUC	UCCCUUGCUU	AAAUUGCACU	GGCAACGUGA	CGGGUCAAGC	GGGGAUGAGG	UGAUCAAAUU	CGACUUUGAA	AAUGAAAACA	CAUUUUCUUA	CAUCCACGGA	UGGCAAGAUU	
721								U--					
841	UGGGUCCUUU	UUUACCCGAG	UCGGUGCAUU	GCACUGAUGG	AACCACCUAU	CUGUUGGAGC	GGCAAAUGCU	GAAUUGUAAC	AUCAUGACCU	AUAAGAUCAU	CGCUACAAAU	UUACGUGGCC	
841	A--												
961	CCCGGGAGAC	ACUACGUCAC	UGUGUAUGGU	UUGAAGACAU	AUCUAAAGUAC	GUGGGAGUCU	CAUUAACUGA	AGACUGGAGU	CUCAAUUCGU	GGAAUUGUGU	CGCGGUGGCC	AAAACACAG	
961							A--C--						
1081	UGAGAGAGGU	AGAGGAGAUU	GCUUUCAGAU	GUUUCAAGGA	Asn AAAUAAAGAA	UGGACCGAGA	ACAUGAAGC	UGUCGCAUCU	AUCUUAUCCG	CCAAGUCGUC	GACUGUAUUU	AUUAACGGUC	
1081					G--	U--							
1201	AGGCUAUCAU	GGCUGGUGAG	CGCUUAGACA	UUGAAGAUUA	Ser UCAUCUAGUG	GCCUUUGCUU	UGACUUUGAA	UCUGUAUCAA	AGUACGAAA	AGCUUACGGC	CCUCCCGCAU	GGGAGGGAU	
1201													
1321	GGAAAGGUUG	GUGCCAUAC	UUCAAAACUA	GGUUUUGGUG	GGGUGGAGAU	UCAUCCAGGG	CGAAAGUAGG	AGGCGUGAGA	ACAUUGGCUA	GCAGAUUUCC	CCUACUACGU	CUGGAUUCUU	
1321													
1441	AUGCGGACAG	UUUUAAGUUU	CUGACUGUC	UCUCAACGU	UGAAGAAUUU	GAGCAAGAUU	CUGUACCAAU	AUCACGUUUG	AGAACGUUUU	GGACUGAAGU	GSACUUUUUC	GACCGGCUUG	
1441							G--				A--		
1561	AGCAUGAAGU	GCAGACAGCC	AAGACCAAGC	GCUGGAAGAA	Ile GAAAGCGAUA	GUGCCGCCAG	CUGCUGAGAU	ACCUCAGGAG	GAGUUUCAUG	AUGCCGCCUGA	GAGUUCGAGC	CCUGAGUCCG	
1561					A--								
1681	UCAGUGAUGA	CGUUAACCG	GUGACUGAUG	UGGUGCCGGA	Lys UGCUGAGGUG	UCUGUUGAGG	UACCAACGGA	CCCUCGUGC	AUAUCUAGAC	ACGGAGCCAU	GAAGGAUUU	GUGCGUUAUU	
1681					C--								
1801	GUAAGAGAUU	ACAUAACAAC	UCCGAGUCUA	AUCUUCGUCA	CCU AUGGGAG	AUUUCCGGCG	GUGCGGGAAG	UGAGAUCGCA	AAUAAGACCA	UCUUUGAGAC	CUACCAUCCG	AVAGACGAUA	
1801													
1921	UGGUGAAUGU	CCAUUUGGCC	AACGUAACU	GGUUGUADCC	UAAAAAUAC	GAUUACACCG	UUGGAUAUA	UGAGCAUGGU	UUAGGUCCGA	AGCACGCAGA	UGAAACGUAC	AUUGUUGAUA	
1921						U--							
2041	AAACAUGUGC	AUGUCUAAC	UUGAGGGACA	UUGCAGAAGC	UAGCGCCAAA	UUUUCUGUCC	CUACAUGCGA	UAUUUCCAUG	GUUGAUGGAG	UUGCGGGAGU	CGGUAAAACC	ACUGCCAUAA	
2041													
2161	AAGAUGCAUU	CCGUUUGGCA	GAGGACCUAA	UUCUGACGGC	GAAUCGUAAA	UCCGCCGAGG	ACGUCAGGAU	GGCUUUUAUUC	CCUGACACUU	UUAAUUCCAA	P he A-- T yr	Ile GACAUUGUGC G-- Val	
2161													
2281	GCACC6CUGA	UUCUGCGAUC	AUGCAGGGUG	UACCGUCCUG	UCAUAGGCGU	CUDGUUGAUG	AGGCUUGUUU	ACUACAUAUC	GGUCAACUCC	UGGUGGUGGC	UCCUCUGUCU	AAUGUUCAC	
2281	G--							U--					
2401	AAGUUCUUGC	CUUUGGGGAC	ACAGAGCAGA	UUUCGUUCAA	GUCUCGUGAC	CGCGGUUUUA	AAUUGCUCCA	CGGUAAUCUG	Lys AAAUUAUGAUC	GCCGUGAGCU	UGUUCACAA	ACUUAACGGU	
2401									C--				
2521	GUCGCAAGA	UGUUUAUCGU	GCUGUUAUUC	UGCUGAAGCG	UAAUUGCGGU	AAUAGGGACA	CGAAGUAUCA	AUCCUGGACA	UCUGAGUCCA	AGUUUUUAG	Ala AAGUCUGCGG A-- Tyr	AAGCGUGUA	
2521													
2641	UUACUUCUGU	UUUGCAGGUC	ACUUAUUGAUC	CGAACAGAAC	GUUUCUUAGC	AUGACUCAAG	CUGAUAAAGC	GGCCUUUCAA	ACGAGGGCUA	AGGAUUUUC	CGUGAGCAAG	GACUGGAUUG	
2641	G--												
2761	AUGGACAUUU	AAAAACAGUA	CACGAAGCGC	AAGGGAUUC	UGUUGACAUA	GUCACUUUGG	UUCGCGUUA	GUCGACCAA	UGUGAUUUUG	UUAAACAUGA	GGAGUACUGU	UUGGUUGCCU	
2761	C--				C--								
2881	UAACACGACA	CAAGAAUGCC	UUUGAGUAUU	GCUUUAACGG	CGAGCUCGCU	GGUGAUUUGA	UCUUUAUUUG	UGUUAAUGGA	UGCGCUUGUC	UCUGUGUGAG	ACCUCUGCUC	GAGGAGAGCC	
2881													
3001	CUGUCCAGG	UAGGAACGUU	GUGGUCUAAC	UUAAGACUAG	CUGAAUCGGU	GCUAUAACCG	AUAGUCGUGG	UUGACACGCA	GACCUCUAC	AAAGAGUGUC	AGGCGCCUUU	GAGAGUUACU	
3001				C--									
3121	CUUUGCUCUC	UUCGGAAGAA	CCCCUAGGGG	UUCGUGCAUG	GGCUUGCAUA	GCAAGUCUUA	GAAUGCGGGU	GCCGUACAGU	GUUGAAAAAC	ACUGUAAAUU	UCUAAAAGAG	ACCA	3234
3121			U--				U--						3234

図19. BMV-ATCC66系統(上段)とBMV-Russian系統(下段)のRNA1の塩基配列の比較  
Russian系統についてはATCC66系統と同一のアミノ酸を(-)で表わし、異なるアミノ酸のみを示し、アミノ酸置換を伴う塩基置換の部位についてはそれぞれの系統のアミノ酸を示した。

1	GUAAACCAG	GAACGAGGU	CAAUCCCUUG	UGGAACCAG	GUUUGCGAA	CACACAUCU	ACCUGUGUG	UGUUGUGUU	UGUUUCUUU	UACUAUCAC	AAGAUGUCU	CGAAAACUG	
1	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
121	GGAGUGAU	UUCGUUGCC	AGGUGCCG	UUUCCAAUG	AUCAUAGAU	AAUCCUAGA	AGACGAGUG	GAGGUGCUA	GCCUUCAGG	Pro	GCCGAGCCG	GCAGACGGAG	UUGCCAUGA
121	---	---	---	---	---	---	---	---	---	Gln	---	---	---
241	CGGAUCUC	GCGAGUUUA	AAUUAAGCA	AGCGCCCUU	GAGAUAGGAG	GCGUGUUGA	UCCCCCUUU	GACCGAGUG	GUGGGGUCU	UAUUUGCGAU	ACCGUCCAG	AAAUGGUUA	
241	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
361	ACAGUUCAC	GAUAGACCA	UGAUUCCUA	GGCUGAAUG	GCACGGAUG	UAUAUCUUGA	CAUCCCGGC	UCUUUCGUAC	UCGAAGAU	AAUCCAGAC	UGGUUCCUG	AGGAUACUAG	
361	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
481	UGACGGUAC	GGUGUAACG	Tyr	Pro	UGGCCCCGA	UGAAGAUCA	GCGAGCGAU	UAAAACUGC	CAGUGAUUC	UGGAACUGU	AAAUCGAGG	AGUUCUGUU	ACUGGAGUA
481	---	---	Ser	Ala	---	---	---	---	---	---	---	---	CCCCCAAGGA
601	GCUGACCCU	GGAGUAAGG	ACAUGGGCA	UGACGAAG	UUUCAGACU	CCAUAUCUG	UUACGACAU	ACUCUUCAG	UCAUGAAUC	UAUUGAACAU	AGGUUUUCG	GGGUUAUUA	
601	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
721	UACGCACUG	CAUCCAGUA	ACCUGACAU	CUCUACUGG	CCAAUUUUA	V al	UGGAGAGAU	CAGCCUUGC	AGAACAGAG	CAACCAUGA	UUCCAUAUC	CCAACCAUG	CUUUAUUCGA
721	---	---	---	---	---	A	---	---	---	---	---	---	---
841	UGAUUCGUAC	CAUCAAGCC	UUGUUGAAA	UGGUGAUUA	UCCAUGGAC	M et	UUGAUAGGA	CAGACUUAAG	CAAAGUGAG	UAGACUGUA	Lys	CAAGGACCC	GAUAAAUUU
841	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	Arg	---	UUAACACAAA
961	AAUGAAUUC	GGGAGUGUC	AGCGAAGAG	UGGUACUCAG	AAAGAAGUC	UAACCGCAC	UAAAAGCGA	AACGCGGAG	UCCAGAAAU	GGGAGACGG	AUUAACAUGA	AGGAAACUGC	Glu
961	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	Asp
1081	GAAGGUAUA	GCAAAGCGU	UUCGUAAGC	AUUCCUUAA	GUUGACGGU	AAGACUGUC	GAGAGCUUC	AUGGAUGUA	UGACUAAGU	UCUUGAGUAC	CAUAAGAAGU	GGGUUAAGCA	
1081	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
1201	CAUGGACUUG	CAAGGUGUGA	AUGUGGCAG	AGAGACUGAU	Arg	UUACGUCGG	ACCAGCAUA	GCUGAAGUC	GAUGUAAAAC	CUGUUGUAC	UGACACCCU	CACUUGGAAC	GAGCAGUAGC
1201	---	---	---	---	U	Cys	---	---	---	---	---	---	---
1321	AGCUACUAUA	ACAUUUCUA	GUAAAGGUG	GACUAGUAU	UUUUCACCC	UUUUCACUG	UUGUUCGAG	AAGUUAUCA	UGGCCUGAA	AUCCAGGUU	AUUGUGCCUA	UCCGAAAGAU	
1321	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
1441	AUCCUCUCUG	GAGCUUAAGA	AUGUCCGCU	GAUUAACAG	UACUUCUUG	AAGCGGACU	AAGCAAAUU	GAUAAAUUC	AGGUGAGCU	GCACCUAGAG	UUUCAGAGAG	AGAUACUCCU	
1441	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
1561	UGCGUGGGC	UUUCCAGCG	CGCUGACGA	UUGGUGUCU	GAUUUUAUC	GCGAUUCUA	UCUAUCAGAC	CCUCAUGCA	AGGUGGAAU	GUCGUGUCC	UUCCAACGCA	GAACUGGUGA	
1561	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
1681	UGCGUUUUA	UAUUUCGGU	AUACUCUUG	CACUAUGGU	AUGAUUGCA	AUGCCUCUG	UCUAAGUGAC	UGUGACUGG	CAAUAUUCU	AGGAGAUAG	UCUUUAUUA	UCUCUAAAGU	
1681	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
1801	UAAACCAGU	UUGGAUACG	AUAUGUAC	GUCUCUCUC	AAUAUGGAG	UAAAAGUCA	GGACCCUAG	GUGCCCUAG	UUUGUAGUA	GUUUUCUGU	GAAACUGAA	UGGCGAAUUU	
1801	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
1921	GGUGUCUAUA	CCAGACCCUA	Met	UGAGAGAGAU	CCAGCGCUA	GCUAAGCGAA	AGAUAUCUG	UGAUGAACAG	AUGCUCAGAG	CACAUUUCU	UUCCUUCUGU	GAUCGAAUGA	AGUUUAUUA
1921	---	---	Val	Leu	---	---	---	---	---	---	---	---	---
2041	UCAACUUGAU	GAGAAGAUA	Met	UUACGAUGU	CUGUCAUUU	GUUUAUCUG	AAUAUGGAA	AGAAAAACU	UGGAUUUUC	AGGAGGUAG	AGCUGCUCU	CGGCUUUUU	CUUUUAUUC
2041	---	---	Tyr	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
2161	CGAGAAUUC	CUGAGGUUC	CUGAUUGCU	CUGUACCGA	GGCAUCAGAG	UUUAUCAGAU	GAGCGAUCCU	GUUAUGAAG	UCAAACGCAC	UACGGAAGAG	CGUAAACUG	AUGGUGACUG	
2161	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
2281	GUUUCACAAC	UGGAAGAUA	CAAAGUUUC	UGGUGUGUA	GACAAAGUC	ACAGAACCCU	Le u	UGGAUUUUA	UCCUCGAGU	GUAGUACUA	GGAGCUCUU	GUCAAACGGA	UCGGACGUUU
2281	---	---	---	---	---	---	Fl e	---	---	---	---	---	---
2401	ACAUGAGGCC	CUUGAGCGUG	AGUCACUAA	AUUAGCGAA	GAUCGAGGA	Ala	CCGCACAAC	CUUGAAAAAG	AAGGUCGAG	AUUAACGUAC	GCGUAGAGGA	GGCCUAAAGU	CAGUUUAGUC
2401	---	---	---	---	---	Tyr	---	---	---	---	---	---	---
2521	UUUGCUCUUG	AAGUCCAUU	Le u	UGAGACUCU	UAAGCCUCU	Lys	GAUCGCUUC	ABAUGAUUA	UGAACCUAAG	CUGUGAACAG	CCCUUUGGUU	AAGGUUAAAA	ACUCCUGGUC
2521	---	---	Val	Ph e	---	Arg	---	---	---	---	---	---	---
2641	AGGUAGACCA	CUUUGGCUAA	GUUUAAAAG	UUGUUGAAU	AGUACAUAU	CUGAVAGUG	UGGUGBACAC	GCAGACCUCU	UACAAGAGUG	UCUAGGUGCC	UUUGAGAGUU	ACUCUUUGCU	
2639	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
2761	CUCUCCGAA	GAACCCUAG	GGGUUCGUG	AUGGGCUGC	AUAGCAAGUC	UUAGAAUGG	GGUACCGUAC	AGUGUUGAA	AACACUGUA	AUCUCUAAA	GAGACCA	2867	
2759	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	2865	

図20. BMV-ATCC66系統(上段)とBMV-Russian系統(下段)のRNA2の塩基配列の比較  
 欠失塩基は\*で表わし、その他は図19と同様に示した。

```

1  GUAAAAUACC AACUAAUUCU CGUUCGAUUC CGGCGAACAU UCUAUUUUAC CAACUCCGU UUUUUCAGUA GUGAUACUGU UUUUGUUCCC GAUGUCUAAU AUAGUUUUCU CCUUCAGUGG
1  -----
121 UUUUCACAGA ACUACGUCUG ACGUUGGCAA GCAAGCGGGA GGUACUAGCG ACGAGAAGCU CAUUGAGUGG CUGUUCUCUG AAAAGGCUGU GAAAGAGAUU GCUGCCGAGU GUAAACUCGG
121 -----
241 AUGUUUAUAC UAUUCGAAGU CUAUUGAACC CCGCAACUAA Leu CUAGACCUGG UGCCAAAGUC ACACGUUAUCU GCUUGGCUUC CAUGGGCUAC Pro ACCCAAGUAA GAUAAAGGAG AGUUUACCUUC
241 -----
361 CAGGSGAUUC AUGAACGUUC CACGCAUCGU UUGUUUUUCU GUUCGUACCA CAGAUAGCGC AGAGUCCGGU UCUAUAACCG UGAGCCUGUG CGAUUCUGSU AAGGCUUCUC GUGUCGAGU
361 -----
481 ACUCGAAGCC AUUGAUAAUC AGGAGGCCAC AAUUCAGUUG UCGGCUUUAU CUGCCUUGAU AGCUUUGAGC CCUAGCUAUG AUUGUCCGAU GGAAGUCAUC GCGGCUCAUA His GCGUAGGAA
481 -----
601 UCGAUGUUUU GGAUAGCAA CCCAACUUAU CCGUGUGGUG GGGACAACG GUUCCGUUGC AGUUACUUAU GCUUAUUGGC AAGCUAAUUU CAAAGCGAAG CCCAACAAUC AUAAUGUGCA
601 -----
721 UGGUCCCGCU ACAAUUAGUG UAAUGCCAUU UGACAGACUG AGACAACUCG AUAAAGAAAG CCUCAAAAUU UACAUCAGAG GUUUUUUUA CCAGUCUGUG GAUCAUGGGU AUCUUCUCGG
721 -----
841 AAGACCGUUA CAUUCUGUUG AUCAGGUUGC CCAGGAAGAU UUGUUAAGUG AGGAAUCCGA GUCUCCUUCG GCUCUCGGCA GAGGUGUGAA GGAAGUAAG UCUGUAUCCG CGUCAUCUGU
841 -----
961 CGCUGGACUU CCUGUGUCCA GUCCUACGCU UAGAAUUAAA UAGGUAUAAC CGGUCUAACA AGCUCGGUCC AUUUUCGUGGA GUUAAGCAAG CUGGGGAGAC CCCCGACAGC CGUUUGGauc
961 -----
1081 AGCGCUCGCG UCUCGUUUGG GUUCAAUUCC CUUACCUUAC AACGGCSUGU UGAGAUAGSU CCUCGGGGGA GGUUAUCCAU GUUUGUGGAU AUUUAUUCUU GUGUGUCUGA GUUAUUUU*
1081 -----
1200 AAAAAAAAAA AGAAAAAAAA AGAUCUAUGU CUUAAUUCAG CGUAUU*UA AUGUGGACUU CAGGAACUGG UAAGAUAGCU CGCGCGCAGC GUCGAGCUGC CGCUCGUAGA AAUCAUUGCA His
1201 -----
1318 CCGCUAGGGU CCAACAGUAU AUUGUGGAAC CACUCGCUAC Th r UGGCCAAGGC AAGGCGGUUA AAGCGAUUCC AGGAUACAGC AUUAUAAAGU GGGAGCGGUC UUCGGACGCG AUUACAGCGA Val
1321 -----
1438 AAGCCACCAA UGCCAUGAGU AUCAUCUCG CCGAUGAGCU CUUUCUGAA AAGAAUAAAG AGCUUAAGSU CGGCAGAGUG CUGCUUUGSU UGGGACUUCU UCCUAGCGUU GCUGGGAGGA Ile
1441 -----
1558 UUAAGGCUUG UGUUGCUGAG AAACAGGCAC AGGCCGAGGC CGCUUUUCAA GUAGCCUUGG CCGUUGCUGA CUCCUCGAAA GAGGUGGUGG CGGCCAUGUA UACGGACGCC UUUCGAGSGG
1561 -----
1678 CGACUCUGGG GGAUUUGCUU AAUUCUCCAG UUUUUCUGUA UGCAUCUGAA GCAGUGCCUG CUAAAGCGGU CGUUGUACAU CUAGAAGUUG AGCAGGUAAG GCCUAGGUUC GAUGACUUCU
1681 -----
1798 UCACCCCGGU UUAUAGGUAG UGCCCCUGCU CGGAGAGGCC CUGACUGGGU UAAAGUUACA GGGCCCUUGU CUCGGGUA GAACCCUGUCC AGGUAGGACA CUUUGGCUAA GGUUAAAGC
1801 -----
1918 UUGUUGAUC AGUACAAUAA CUGAUAGUCG UGUUUUACAC GCAGACCUCU UACAAGAGUG UCUAGGUGCC UUUAGAGUU ACUCUUUGCU CUCUUCGGAA GAACCCUUG GGGUUCGUGC
1921 -----
2038 AUGGGCUGUC AUAGCAAGUC UUAGAAUGCG GGUACCGUAC AGUGUUGAAA AACACUGUAA AUCUCUAAA GAGACCA 2114
2041 -----

```

図21. BMV-ATCC66系統(上段)とBMV-Russian系統(下段)のRNA3の塩基配列の比較  
図20と同様に示した。

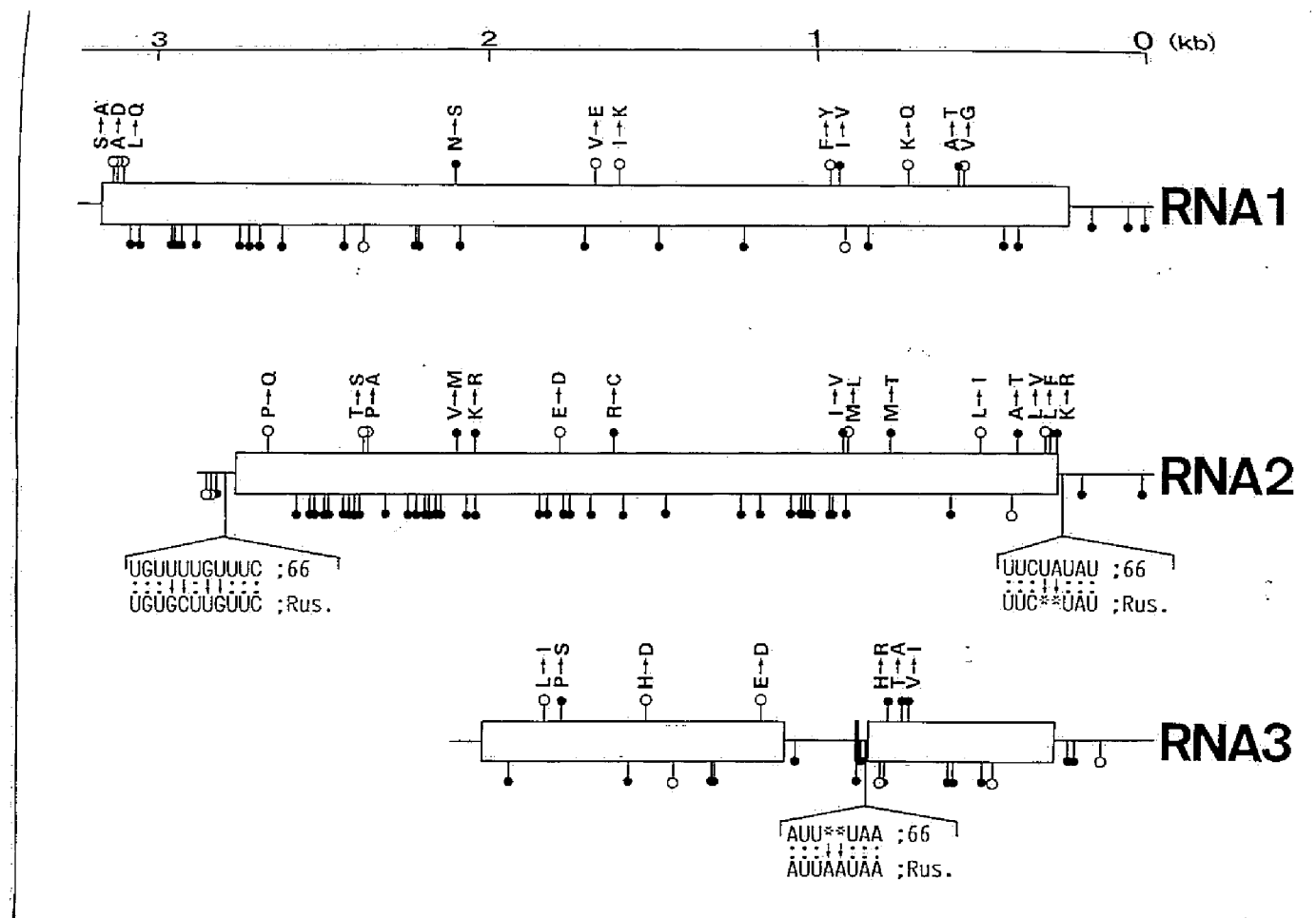


図22. BMV RNAのゲノム構成およびBMV-ATCC66系統とBMV-Russian系統のゲノムRNA間でみられる塩基配列の違いとそれに伴うアミノ酸変異の模式図

白抜きのカラムは各ゲノムRNA中の翻訳領域を示し、アミノ酸置換を伴う塩基置換はカラムの上に示した。置換はATCC66系統(66)からRussian系統(Rus.)への置換として表わした。(↑)と(↓)はそれぞれtransition型とtransversion型の塩基置換を表わす。|: ポリ(A)配列



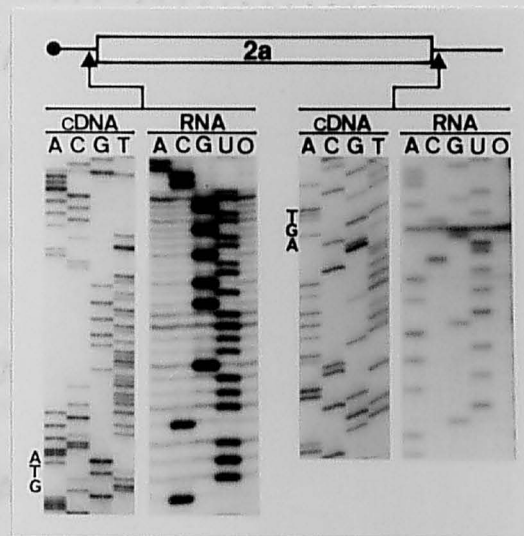


図23. BMV(ATCC66系統)のRNA2の非翻訳領域の塩基配列分析を示す7.5%ポリアクリルアミドシーケンスゲルのオートラジオグラムとそれらの領域のRNA2中の位置を示す模式図

phagemid由来の一本鎖cDNAを鋳型とし、ddATP(レーンA)、ddCTP(レーンC)、ddGTP(レーンG)およびddTTP(レーンT)存在下で、Sequenase™によってシーケンス反応を行った。cDNAクローニングの鋳型として用いたウイルスRNAの塩基配列は、図4と同様にして決定した。pBTF2内のcDNA中の2a蛋白質(2a)翻訳領域の開始コドン(ATG)と終始コドン(TGA)を表示した。

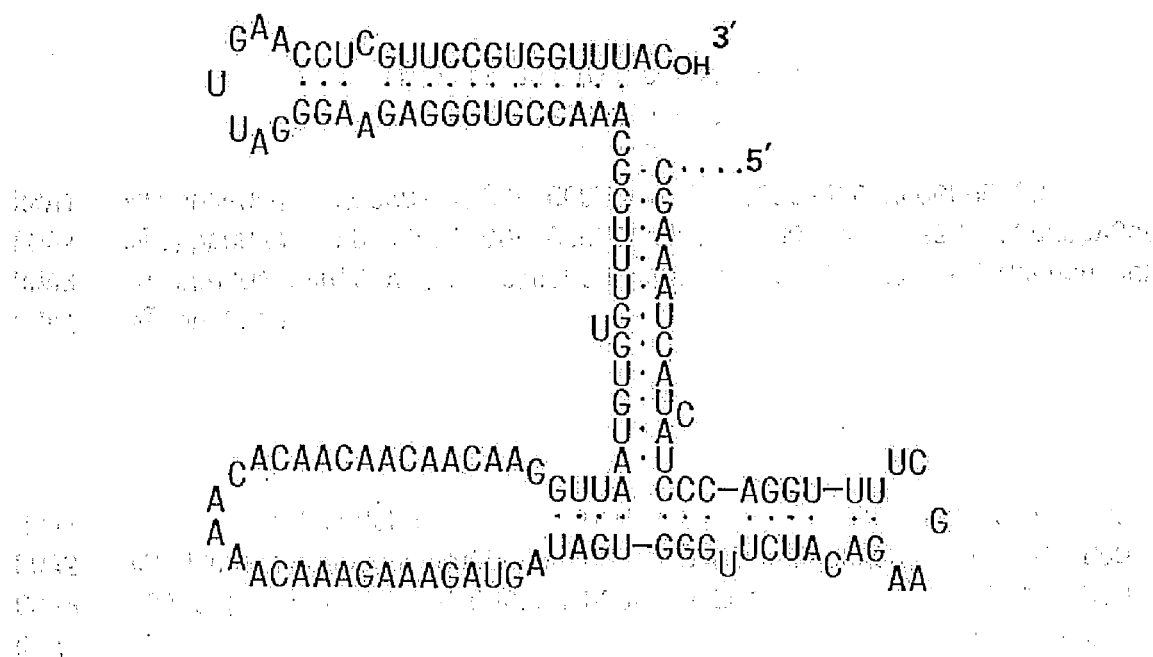


図24. BMV(ATCC66系統)のRNA2のマイナス鎖の3'端に  
おける形成可能な二次構造

Marshら<sup>77)</sup>のデータを参考に作製した。

(PolIII Box B/TψC Consensus)

GGUUCAAn<sup>n</sup>CC

#####

RNA1 m<sup>7</sup>GpppGUA<sup>g</sup> ACCACGGAACGA GGUUCAAUCCCCUUGUCGACC ACCGGUUCUGC  
 RNA2 m<sup>7</sup>GpppGUA<sup>A</sup> ACCACGGAACGA GGUUCAAUCCCCUUGUCGAaCcACGGUU UGCgaaACac  
 RNA3 m<sup>7</sup>GpppGUA<sup>A</sup>aa<sup>u</sup>ACCAacuAAuucucGUUCgAUuCC GgCGA ACa UUCUauuuuACca  
 RNA4 m<sup>7</sup>GpppGUA<sup>u</sup>

A  
 (Kozak Box) XX AUG G  
 G

RNA1 uaCUUGUUCUU UGUUUUU CACCaacAAA AUG UCa ...  
 RNA2 ACAUCuaacCUUGUUGUUGUuGUGuUu UGUUUcUuUcuacuauCAGC AAG AUG UCU ...  
 RNA3 ACAUCgg UUUUUucaGUaGUaUacUGUUUUUgUuc ccG AUG UCU ...  
 RNA4 uua AUG UCg ...

図 25. BMV(ATCC66系統)のRNA1、2、3および4の5' 端の塩基配列の比較

2種以上のRNAで同じ塩基のものは大文字で示した。真核生物型のRNAポリメラーゼIIIのプロモーターのコンセンサス配列(PolIII Box B/TψC Consensus)と真核生物型の翻訳開始コドンの周辺のコンセンサス配列(Kozak Box)を示した。

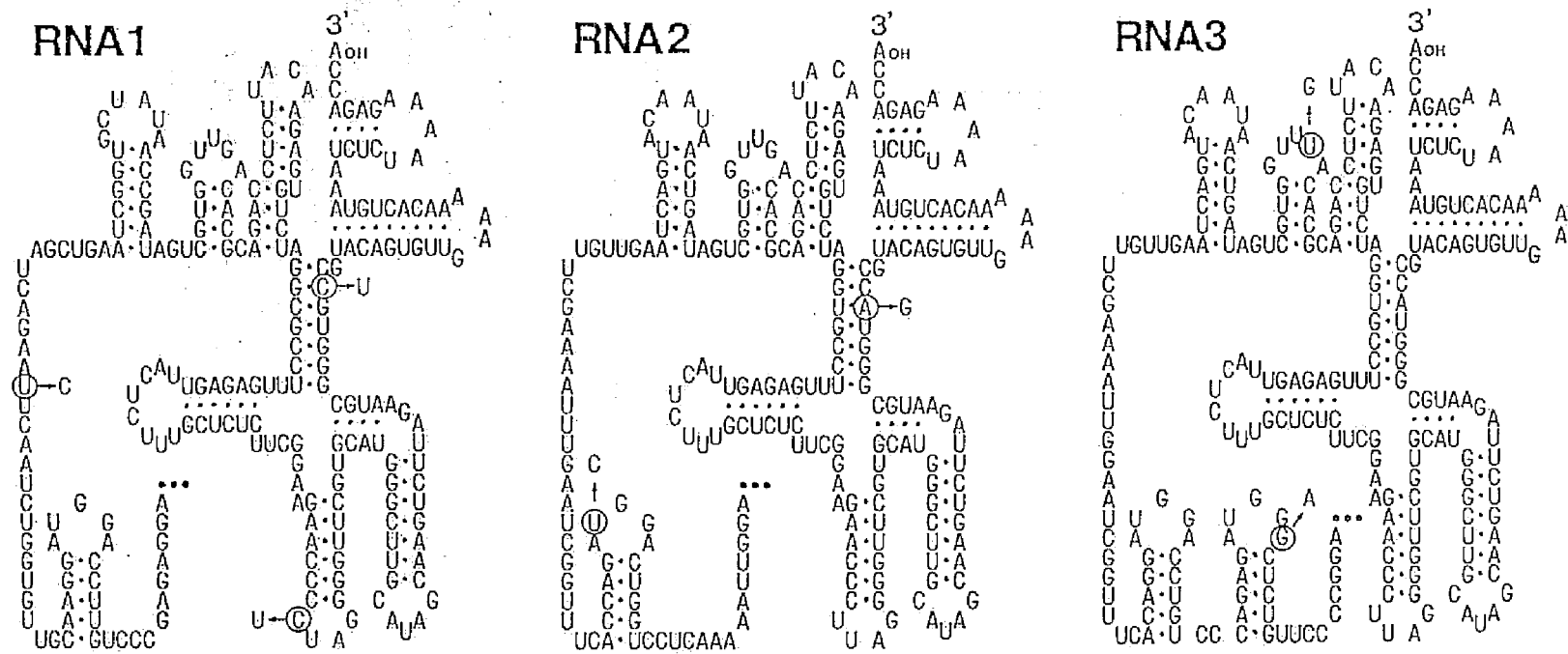


図26. BMV(ATCC66系統)のRNA1、2および3の3'端で形成可能な二次構造の模式図  
 Ahlquistら<sup>2)</sup>のデータを参考に作製した。円中はBMV Russian系統と異なる  
 ATCC66系統のRNAの塩基を表わし、矢印によってRussian系統の塩基も示した。

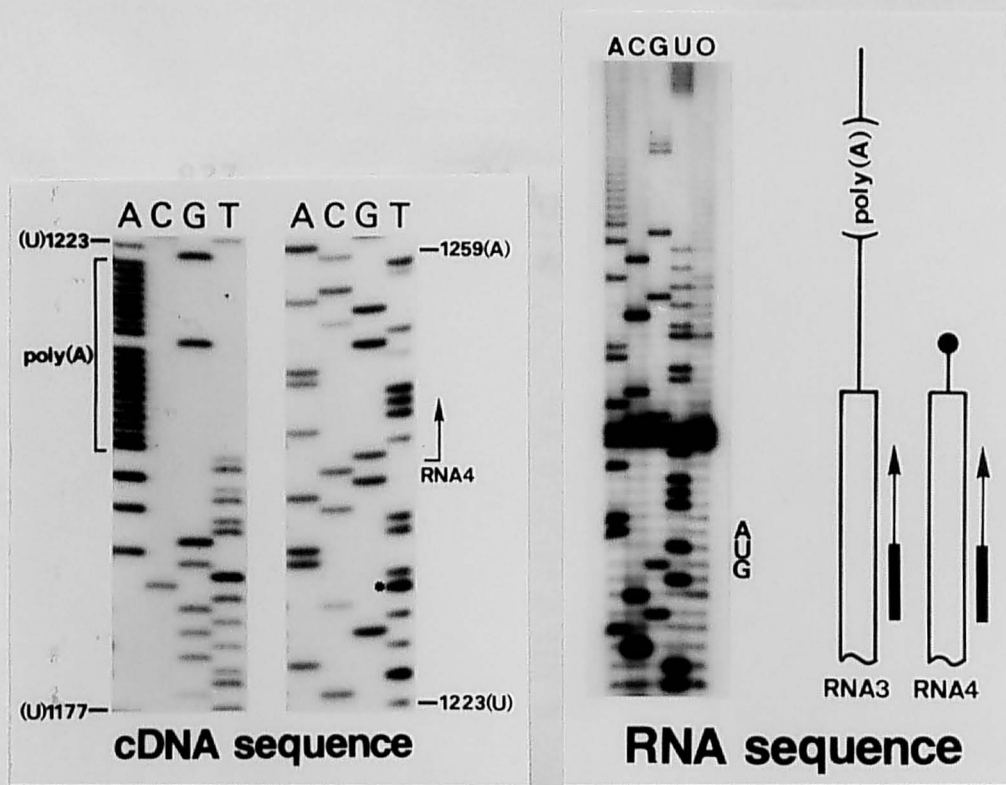


図27. BMV(ATCC66系統)のRNA3のintercistronic領域の塩基配列のcDNA（左側のパネル）とRNA（右側のパネル）における分析を示す7.5%ポリアクリルアミドシーケンスゲルのオートラジオグラムとRNAの塩基配列決定に用いたプライマーの反応の方向を示す模式図

cDNAとRNAの塩基配列は、図23と同様にして決定した。RNAシーケンスにはRNA3の塩基番号1274～1288に相補的なデオキシオリゴヌクレオチドの5'端を $^{32}\text{P}$ でラベルしたものをプライマーとして用いた。——→: RNAシーケンス用のプライマーとcDNA合成の方向、\*: Russian系統との間で異なる塩基

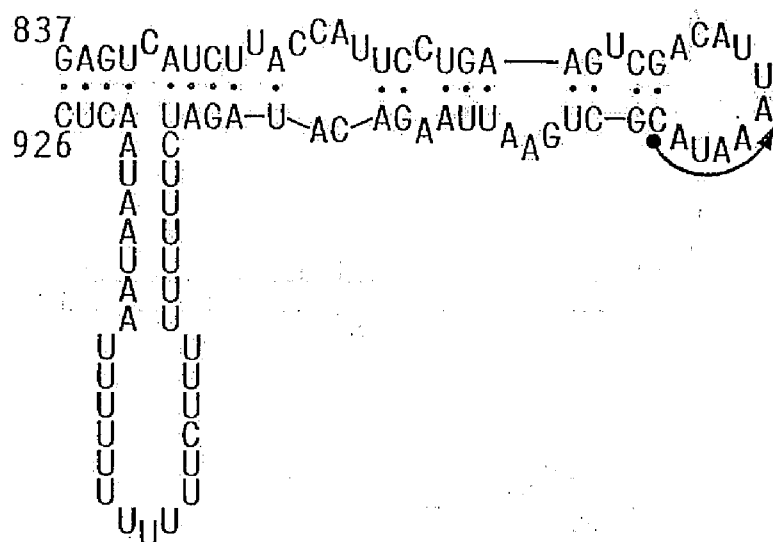


図28. BMV(ATCC66系統)のRNA3のマイナス鎖のサブゲノムプロモーター領域で形成可能な二次構造  
Marshら<sup>76)</sup>のデータを参考に作製した。●→: RNA4の5'末端の塩基に相補的な塩基とRNA4の転写の方向

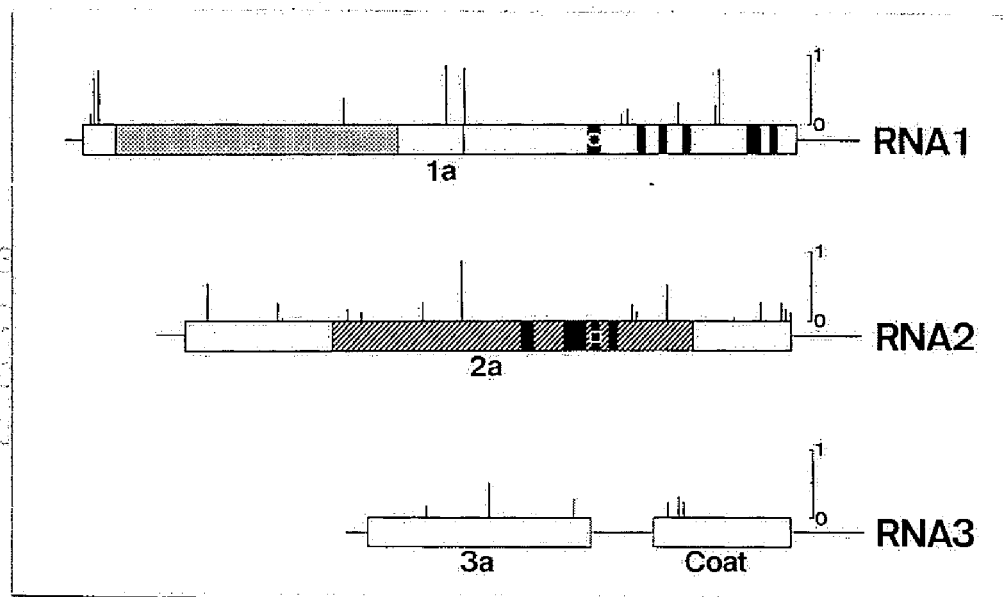


図29. BMVのATCC66系統とRussian系統の間で異なるアミノ酸の性質の違い

性質の違いの程度は、Miyataら<sup>86)</sup>の値をもとにカラムの上部に垂直な線の長さで表した。影の領域は多くの植物、動物ウイルス間で保存されたアミノ酸配列と相同性が高い領域を示す<sup>87)</sup>。RNA1とRNA2の ■ はそれぞれ大腸菌のヘリカーゼと相同性が高いモチーフ<sup>5,88)</sup> およびRNA依存ポリメラーゼ間で保存されたモチーフ<sup>86)</sup>を表わす。\*: ナクレオチド結合ドメイン、■: ポリメラーゼドメイン

1a: 1a蛋白質、2a: 2a蛋白質、3a: 3a蛋白質、Coat: 外被蛋白質

BMV-ATCC66: 153-PSYDCPMEvIGghsgRnRCFGiaTQLsGV-121  
 BMV-Russian: 153-PSYDCPMEvIGgdsgRnRCFGiaTQLsGV-121  
 CCMV: 154-PSYDCPMqmIG...nRhRCFGlvTQLdGV-122  
 CMV-Q: 141-PtYDCPMElvG...nRhRCFavvverhGy-112

図30. BMV(ATCC66系統とRussian系統)、CCMVおよびCMV(Q系統)の  
 3a蛋白質の中央部のアミノ酸配列の比較

3種類以上のウイルス間で同一なアミノ酸は太字で表した。

数字は表示されたアミノ酸配列の前後にあるアミノ酸残基

の数を表す。...: アミノ酸配列間のギャップ、▼: ATCC66

系統とRussian系統の間で異なるアミノ酸



## 第V章. BMV ATCC66系統の外被蛋白質翻訳機構の解析

プラス鎖RNAウイルスは宿主細胞に侵入した後、まず最初にウイルス蛋白質がウイルスRNAから合成される。その際、ウイルスは代謝系を全く持たないので、そのような蛋白質合成は完全に宿主細胞が持つ翻訳装置に依存して行われる。したがって、ウイルスRNAのその蛋白質合成は真核生物型であり、mRNA活性を持つプラス鎖RNAはmonocistronicなmRNAとして機能する<sup>65)</sup>。一方、TMVのゲノムRNAあるいはBMVのRNA3をはじめとして多くの植物ウイルスRNAは、見かけ上polycistronicなmRNA構造をしており、*in vitro*蛋白質合成系においては、5'端に最も近いシストロンからのみ翻訳が起こる<sup>111)</sup>。そこで、これらのRNAは下流のシストロンから蛋白質合成を行うためにサブゲノムRNAを合成し、真核生物型の翻訳装置に適合する戦略をとっている。BMVの外被蛋白質遺伝子はRNA3の3'端側にコードされており<sup>3)</sup>、RNA3の複製中間体であるマイナスセンスのRNA3の中央部に存在するinternal promoterから転写されるサブゲノムRNA4から翻訳されと考えられている<sup>83)</sup>。

本章では、BMV ATCC66系統で検出される二種類の外被蛋白質の合成機構を明らかにした。前章で、粒子が一種類の外被蛋白質から構成されているBMV Russian系統と二種類から構成されているATCC66系統の全塩基配列を比較した。その結果ATCC66系統では、外被蛋白質のmRNAであるRNA4の転写開始プロモーターの一部でもあり、翻訳開始に関与するリーダー配列でもあるRNA4の5'端非翻訳領域に(AA)配列の欠失がみられた。そこでまず、ATCC66系統のRNA3中のRNA4の5'端非翻訳領域に(AA)配列を復帰させ、これを用いて*in vivo*における外被蛋白質合成およびRNA4合成に対する影響を調べた。また、*in vitro*でRNA4を合成する系を確立し、このような(AA)配列の有無が外被蛋白質合成に及ぼす影響について、*in vitro*蛋白質合成系で調べた。さらに、この*in vitro*蛋白質合成系を用いて、ATCC66のRNA4から二種類の外被蛋白質が翻訳される機構について詳細な実験を行った。

## 材料と方法

## 1. Kunkel法による点突然変異体の作製

点突然変異体の作製にはKunkelらの方法<sup>69)</sup>と市販のキット(Mutan<sup>TM</sup>-K、宝酒造社)の説明書を参考にし、植物病理学研究室で確立された方法を用いた。

*E. coli* BW313株は、*dut*<sup>-</sup>、*ung*<sup>-</sup>の大腸菌であるため、DNA中のthymine(T)の一部がdeoxyuracil(dU)に置き変わったDNAを合成する。このBW313を宿主菌として、変異導入の目標となる遺伝子をクローニングしたphagemidの一本鎖DNAを調製した。これに変異導入用の合成オリゴヌクレオチドをハイブリダイズさせ、ポリメラーゼ反応とリガーゼ反応により相補鎖を合成した。このDNAで*ung*<sup>+</sup>の大腸菌(BMH71-18 *mutS*株)を形質転換すると、DNAのミスマッチをおさえながら、もとのdUの含まれている側のDNAはUng産物の酵素によって分解されるが、*in vitro*で合成された相補鎖の側は分解されずに複製される。このようにしてDNAが選択を受け、変異の導入されたDNAを含むプラスミドが得られた。BMH71-18 *mutS*株で長時間プラスミドを増幅させ続けると、突然変異が蓄積する可能性があるので、短時間培養した後DNAを抽出し、直ちにDH5 $\alpha$ 株にDNAを導入した。

### 1) dUを含む一本鎖DNAの調製

目的とする部位を含むDNA断片をpUC118にクローニングした。このDNAで*E. coli* BW313株を形質転換し、37°Cで16時間培養した。形成されたコロニーを150  $\mu$ g/mlのアンピシリンを含む3 mlの2 $\times$ YT培地(1.6%(w/v) Bacto-tryptone、1%(w/v) Bacto-yeast extract、0.5%(w/v) NaCl、NaOHでpH 7.6に調整)に植え継ぎ、37°Cで7.5時間振盪培養した。150  $\mu$ l/mlのアンピシリンを含む50 mlの2 $\times$ YT培地に1 mlの培養液を入れ、37°Cで1時間振盪培養した。m.o.i.が2~10になるようにM13 KO7を加え、37°Cで30分間振盪培養した。70  $\mu$ g/mlになるようにカナマイシンを加え、37°Cで18時間振盪培養した。遠心分離(12,000 $\times$ g、10分間)後、40 mlの上清を別のチューブに移した。8 mlのファージ沈澱溶液(20% PEG<M.W.6,000>、2.5 M

NaCl)を加えよく混和した後、室温に15分間置いた。遠心分離( $18,000 \times g$ 、15分間)後、得られた沈澱を2.5 mlのTEバッファーに懸濁した。1.25 mlのTE飽和フェノールを加えた後、約10秒間激しく混合し、室温に10分間置いた。再び激しく混合した後、遠心分離( $3,500 \times g$ 、3分間)し、上清を別のチューブに移した。フェノール抽出、フェノール/クロロホルム抽出およびクロロホルム抽出を1回ずつ行った後、エーテル抽出を3回行い、エタノール沈澱し50  $\mu$ lのDWに溶解した。A<sub>260</sub>/<sub>280</sub>=25を利用して濃度を測定し、0.4 pmole/ $\mu$ lに調整した。

## 2) 変異導入用オリゴヌクレオチドとそのりん酸化

置換突然変異体の作製には、FM401 d(CTATCGTATTA<CGT>TAATGTCGAC)、FM402 d(CTATAGTATT<CGT>ATAATGTCGAC)、FM403 d(CTATAGTATT<CGT><CGT>TAATGTCGAC)、FM408 d(ATTAAATAATG<ACG>CGACTTCAGG)およびFM409 d(GTATTTAATG<ACG>CGACTTCAGG)を、欠失突然変異体の作製には、FM404 d(CTATAGTATTAAATGTCGACT)、FM405 d(ACATAGTATATAATGTCGAC)、FM406 d(CACTATAGTAAATAATGTCGAC)およびFM407 d(TCATATAGTTAATAATGTCGAC)の合成オリゴヌクレオチドを用いた。<>内は、その部位が混合塩基になっていることを示す。これらのオリゴヌクレオチドを合成、精製し5 pmole/ $\mu$ lに調製した。2  $\mu$ lの合成DNA(5 pmole/ $\mu$ l)に4  $\mu$ lのDW、2  $\mu$ lの5×りん酸化バッファー(500 mM Tris-HCl, pH 8.0, 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 35 mM DTT)および1  $\mu$ lの10 mM ATPを加えた後、1  $\mu$ lのT4-PNK(10 units/ $\mu$ l)を加え、37°Cで1時間反応させた。70°C、10分間の熱処理によって酵素を不活化した。

## 3) 相補鎖の合成

0.5  $\mu$ lの一本鎖DNA(0.4 pmole/ $\mu$ l)に1  $\mu$ lの20×アニーリングバッファー(200 mM Tris-HCl, pH 8.0, 100 mM MgCl<sub>2</sub>, 500 mM NaCl, 10 mM DTT)、8.5  $\mu$ lのDWおよび10  $\mu$ lのりん酸化オリゴヌクレオチドを加え、70°Cに15分間置いた後徐冷し、30～60分後に37°Cになった時点から37°Cに15分間保った。このアニーリング溶液

から1.2  $\mu$ lをとり、15  $\mu$ lの相補鎖合成バッファー(50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 60 mM 酢酸アンモニウム, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM DTT, 1 mM NAD, 0.5 mM dATP, 0.5 mM dCTP, 0.5 mM dGTP, 0.5 mM dTTP)、0.6  $\mu$ lのE. coli DNAリガーゼ(60 units/ $\mu$ l、宝酒造社)および0.15  $\mu$ lのT4 DNAポリメラーゼ(4 units/ $\mu$ l、宝酒造社)を加え、0°Cで5分間、25°Cで1時間さらに37°Cで1時間反応させた。1.8  $\mu$ lの0.2 M EDTAを加え、65°Cで5分間保ち反応を停止させた後、-20°Cに保存した。

#### 4) 形質転換、点突然変異体のスクリーニングおよび変異体DNAの調製

200  $\mu$ lずつマイクロチューブに分注し、-70°Cで保存したE. coli BMH71-18 mutS株のコンピテント細胞を取り出し、氷上に置いた。融解したところで30  $\mu$ lずつポリプロピレン製培養チューブに分注した。ただちに、3  $\mu$ lのDNA溶液を加え緩く混合した後、氷中に30分間保った。42°C、45秒間の熱処理を行った後、氷中に2分間保った。300  $\mu$ lのSOC培地を加えた後、37°Cで1時間振盪培養した。50  $\mu$ g/mlのアンピシリンを含むLM寒天平面培地にプレーティングし、37°Cで12時間培養した。生育したコロニーのいくつかを50  $\mu$ g/mlのアンピシリンを含む3 mlのLB培地に植え継ぎ、37°Cで12時間振盪培養した。各クローンからプラスミドDNAを調製した後、PEG沈澱<sup>75)</sup>によって精製し20  $\mu$ lのDWに溶解した。10  $\mu$ lについてアルカリ処理後、塩基配列を決定し、目的のクローンをスクリーニングした。残りのDNA溶液を10<sup>4</sup>倍に希釈した液1  $\mu$ lを用いて10  $\mu$ lのE. coli DH5 $\alpha$ 株を形質転換し、コロニーを得た。任意のシングルコロニーについてアルカリ溶菌法<sup>75)</sup>と塩化セシウム遠心分離<sup>75)</sup>によってプラスミドDNAを調製した。この最終DNAサンプルについて再び塩基配列を決定し、目的のクローンであることを確認した。

## 2. In vitro蛋白質翻訳系

### 1) ウサギ網状赤血球ライセート(BRL社、以下ライセート)

10  $\mu$ lのライセートに2  $\mu$ lのin vitro転写RNAあるいはウイルスRNA(0.5  $\mu$ g/ $\mu$ l)、1.3  $\mu$ lの2 M 酢酸カリウム、3  $\mu$ lのアミノ酸混合液(L-メチオニン以外の19種のアミノ酸をそれぞれ500  $\mu$ Mの濃度で含む)、5  $\mu$ lのL-[ $^{35}$ S]メチオニン(1  $\mu$ Ci/ $\mu$ l, Amersham社)および8.7  $\mu$ lのDDWを加え全量を30  $\mu$ lとし、30°Cで60分間反応させた。反応後、10  $\mu$ lの4×クラッキングバッファー(SDS-PAGE用)を加え、反応を停止するとともに蛋白質を可溶化し、SDS-PAGEおよびフルオログラフィーに供した。

## 2) コムギ胚芽抽出物(Amersham社、以下WGE)

5  $\mu$ lのWGEに2  $\mu$ lのin vitro転写RNAあるいはウイルスRNA(0.5  $\mu$ g/ $\mu$ l)、1  $\mu$ lの1 M 酢酸カリウム、0.67  $\mu$ lのアミノ酸混合液(L-ロイシン以外の19種のアミノ酸をそれぞれ1 mMの濃度で含む)、0.33  $\mu$ lのRNasin(40 units/ $\mu$ l, Promega社)および1  $\mu$ lのL-[4,5- $^3$ H]ロイシン(5  $\mu$ Ci/ $\mu$ l, Amersham社)を加えた後、25°Cで60分間反応させた。反応後、35  $\mu$ lのTEバッファーと15  $\mu$ lの4×クラッキングバッファー(SDS-PAGE用)を加え、反応を停止するとともに蛋白質を可溶化し、SDS-PAGEおよびフルオログラフィーに供した。

## 3. フルオログラフィー

$^3$ HでラベルされたRNAはUrea-PAGEを行い、 $^3$ H、 $^{35}$ Sでラベルされた蛋白質はSDS-PAGEを行った後、クマジー染色した。Urea-PAGEのゲルあるいは、染色・脱色したSDS-PAGEのゲルを増感剤(ENLIGHTNING™, DuPont社)に浸漬し、15~30分間振盪した。ゲルを減圧乾燥し、3MMろ紙に貼り付けた後、X線フィルムに密着させオートラジオグラフィー用カセットに入れた。所定の可視化が得られるまで、-70°Cでフィルムを露光させた後、現像した。

## 結 果

### 1. 変異RNA3の作製と*in vivo*における外被蛋白質翻訳の解析

#### 1) RNA4の5'端非翻訳領域に(AA)配列を復帰させたRNA3(F3W)の調製と*in vivo*における外被蛋白質翻訳の解析

##### ①RNA4の5'端非翻訳領域に(AA)配列を復帰させたRNA3(F3W)の調製

F3Wを転写できるベクターpBTF3Wを作製した。プライマーW31 d(GATCTATGCTCTTAATTCAGCGTATTAATAATG)とプライマーW32 d(TCGACATTATTAATACGCTGAATTAAAGACATA)をリン酸化した後、ハイブリダイズし、リンカーW3とした。pBTF3をBgl II (N1220)/Sal I (N1250)で処理し、CIPで脱リン酸化したものにリンカーW3をライゲーションすることによって、pBTF3由来の32塩基対のBgl II /Sal I 断片とリンカーとが置換されたベクターであるpBTF3Wを得た。pBTF3WをEcoR I で切断し、キャップアナログ存在下でT7 RNAポリメラーゼによって転写し、転写産物(F3W)を得た(図31)。

##### ②オオムギプロトプラストにおける分析

F3またはF3WをF1、F2と混合しオオムギプロトプラストに接種し、ウェスタンブロッティング法でウイルス蛋白質を検出した。その結果、F1+F2+F3を接種した区(以下、F3接種区)とF1+F2+F3Wを接種した区(以下、F3W接種区)とで検出された1a、2aおよび3a蛋白質は全く同一の泳動パターンを示した。それに対して外被蛋白質は、F3接種区で2種類検出されたのに対して、F3W接種区では、下のバンドが薄くなり、ほとんど分子量の大きい方のバンドのみが検出された(図32-A)。オオムギプロトプラストに*in vitro*転写産物を接種し、<sup>3</sup>HウリジンでウイルスRNAをラベルした。その結果、F3接種区、F3W接種区ともに検出されたRNA1、RNA2、RNA3およびRNA4の量はほとんど同レベルであり、また新たな分子量のRNA4は検出されなかった(図32-B)。

### ③オオムギ植物体における分析

オオムギの第一葉に*in vitro*転写産物を接種した結果、F3接種区、F3W接種区ともに接種7～8日後には第2葉の基部に病徴が見え始め、接種21日後には両接種区ともに6個体中5個体でモザイク病徴が認められた。第二、第三葉からウイルス粒子を回収した結果、1gの感染葉からのウイルス回収率は、F3接種区では0.8 mg、F3W接種区では1.1 mgとほとんど差はなかった。粒子を構成する蛋白質をSDS-PAGEによって分析した結果、F3接種区ではウイルスRNA接種区と同様に2種類の外被蛋白質が検出されたのに対して、F3W接種区では1種類の外被蛋白質が検出された(図33)。粒子に含まれるRNAをアガロースゲル電気泳動によって分析した結果、F3、F3W両接種区ともにウイルスRNA接種区と同様なパターンを示した(図33)。粒子に含まれるRNAの5'端非翻訳領域の塩基配列を決定した結果、子孫ウイルスのRNAの塩基配列は、接種源に用いたRNAあるいは*in vitro*転写産物の塩基配列と全く同様であった(図33)。

### 2) 外被蛋白質遺伝子のC末端付近にFrame shift変異を持つRNA3(M41)の調製とオオムギプロトプラストにおける分析

M41を転写できるベクターpBM41を作製した。pBTF3のcDNA内部にはXba I 部位が2ヶ所存在する。pBTF3をエチジウムブロミド存在下でXba I で部分切断し平滑処理によって4塩基対の挿入を行った後、セルフライゲーションした。得られたクローンの中で、外被蛋白質遺伝子のC末端付近のXba I (N1757) 部位に4塩基挿入のみられたクローンをpBM41とした。pBM41をEcoR I で切断し、キャップアナログ存在下でT7 RNAポリメラーゼによって転写し、転写産物(M41)を得た。F3またはM41をF1、F2と混合しオオムギプロトプラストに接種し、ウェスタンブロッティング法でウイルス蛋白質を検出した。その結果、F1+F2+M41を接種した区(以下、M41接種区)、F3接種区ともに検出された1a、2aおよび3a蛋白質の量および分子量は同じであった。それに対して外被蛋白質は、F3接種区、M41接種区ともに2種類検出されたが、M41接種区での蛋白質は、いずれもF3接種区のものより分子量が小さかった。(図

34)。

## 2. 変異RNA4の作製とin vitroにおける外被蛋白質翻訳の解析

1) 5' 端非翻訳領域で(AA)配列の欠失したRNA4(F4)および(AA)配列を復帰させたRNA4(F4W)の調製とin vitroにおける外被蛋白質翻訳の解析

①5' 端非翻訳領域で(AA)配列の欠失したRNA4(F4)および(AA)配列を復帰させたRNA4(F4W)の調製

F4とF4Wをそれぞれ転写できるベクターpBTF4とpBTF4Wを作製した。プライマーF41 d(GTATTTAATG)とプライマーF42 d(TCGACATTAAATAC)をりん酸化した後、ハイブリダイズし、リンカーF4とした。プライマーW41 d(GTATTAATAATG)とプライマーW42 d(TCGACATTATTAATAC)をりん酸化した後、ハイブリダイズし、リンカーW4とした。pBB3をSnaB I (cDNAの5' 端)/Sal I (N1250)で処理し、CIPで脱りん酸化したものにリンカーF4およびリンカーW4をライゲーションすることによって、pBB3由来の1252塩基対のSnaB I /Sal I 断片がそれぞれリンカーF4およびリンカーW4で置換されたベクターであるpBB4およびpBB4Wを得た。RNA3とRNA4の5' 端はともに5' GUA 3'である。したがって、pBB3と同様にpBB4、pBB4WもcDNA配列の5' 端に制限酵素SnaB I (CATGTA)部位をもたせることができた。pBB4およびpBB4WをSnaB I /EcoR I で切断しcDNA断片を得た。Nsi I 処理し、平滑化処理した後、EcoR I 処理した転写ベクターpUCTにそれぞれのcDNA断片を挿入し、pBTF4およびpBTF4Wを得た。pBTF4およびpBTF4WをEcoR I で切断し、キャップアナログ存在下でT7 RNAポリメラーゼによって転写し、転写産物(F4およびF4W)を得た(図31)。

### ②In vitro蛋白質合成系における分析

In vitro蛋白質合成系として市販のコムギ胚芽抽出液を用いた。真核生物型の蛋白質合成にはmRNAの5' 端のキャップ構造が重要であるとされている<sup>65)</sup>。BMV RNA4からの外被蛋白質合成においてもキャップ構造が重要であるかどうかを調べ



るために、キャップ構造をもつRNA4とまたないRNA4を合成した。すなわち、T7 RNAポリメラーゼを用いたin vitro RNA合成系にキャップアナログ(m<sup>7</sup>GpppG)を加えた場合キャップ構造をもつRNA4が、加えない場合キャップ構造をもたないRNA4が合成される。F4とF4Wでそれぞれキャップ構造をもつものとまたないものを合成し、in vitro蛋白質合成系に加えた。その結果、いずれの場合でもキャップ構造が存在することによって100倍以上の翻訳活性の上昇がみられた(図35)。キャップ構造をもつF4およびF4Wからの翻訳産物をもっと明瞭に検出するためにSDS-PAGEに供試するサンプル量を少なくした。その結果、F4ではウイルスRNA4と同様に2種の外被蛋白質が、F4Wでは、下のバンドが薄くなり、ほとんど長い方のバンドのみが検出された(図36)。また、ウイルスRNAとF4を比べると2種の外被蛋白質の翻訳量の比に差異は見られなかったことから、他のRNA1、2および3あるいはその翻訳産物はin vitroにおけるRNA4からの2種の外被蛋白質の翻訳には、影響しないことが分かった。

## 2) 外被蛋白質遺伝子の1番目の翻訳開始コドンと2番目の開始コドンの間にframe shift変異を持つRNA4(F4FSとF4WFS)の調製とin vitroにおける分析

F4FSとF4WFSを転写できるベクターpBTF4FSとpBTF4WFSを作製した。pBTF4とpBTF4WをSal I (N1250)で切断し平滑処理によって4塩基対の挿入を行った後、セルフライゲーションし、pBTF4FSとpBTF4WFSを得た。pBTF4FSとpBTF4WFSをそれぞれEcoR Iで切断し、キャップアナログ存在下でT7 RNAポリメラーゼによって転写し、転写産物(F4FSとF4WFS)を得た。得られたRNAをin vitro蛋白質合成系に加えた結果、F4FS、F4FS4Wともに長い方のバンドは消失し、短い方のバンドのみが検出された(図37)。

## 3) 1番目の翻訳開始コドンの周辺に変異をもつRNA4の調製とin vitroにおける分析

### ① 1 番目の翻訳開始コドンの周辺に変異をもつRNA4の調製

Kunkel法<sup>69)</sup>によってRNA4 cDNA中の1番目の翻訳開始コドンの周辺に種々の変異を導入した。本法ではまず一本鎖DNAを調製しなければならないので、pBTF4あるいはpBTF4WのcDNA断片をphagemid pUC118に移した。まず、pBTF4のHindIII (N1914)/EcoR I (MCS)断片をpUC118のHindIII/EcoR I 部位に導入しpF48を得た。pBTF4あるいはpBTF4WのHindIII断片(T7プロモーターの5'端とN1914)をpF48のHindIII部位に正方向に挿入し、それぞれpF4118あるいはpF4W118を得た。pF4118あるいはpF4W118にはT7プロモーター配列のすぐ下流にそれぞれF4あるいはF4Wに相当するcDNA配列が挿入されている。また、ヘルパーファージによってマイナスセンスの一本鎖DNAを調製できるので、一本鎖DNAに材料と方法で述べた種々の変異導入用プライマーをハイブリダイズさせ種々のクローンを得た。得られたクローンからDNAを調製し、それぞれEcoR I で切断し、キャップアナログ存在下でT7 RNAポリメラーゼによって転写し、転写産物を得た。pF4W118の一本鎖DNAを鋳型にし、プライマーFM401からはF4AC、F4AGとF4AU、FM402からはF4CA、F4GAとF4UA、FM403からはF4CG、F4CU、F4GG、F4GU、F4UC、F4UGおよびF4UU、またFM408からはF4WA1、F4WC1とF4WG1が得られた。pF4118の一本鎖DNAを鋳型にし、FM404からはF4D1、FM405からはF4D2、FM406からはF4D3、FM407からはF4D4、またはFM409からはF4A1、F4C1とF4G1が得られた。プラスミドDNAあたりの転写産物量は、クローンごとにばらつきがみられたが、塩基配列と転写量との間には特に特異性は認められなかった(図38)。これらの転写産物は、モル数をそろえてからin vitro蛋白質合成系に加えた。

### ② 1 番目の翻訳開始コドンの3塩基あるいは4塩基上流に種々の塩基置換をもつRNA4における外被蛋白質の翻訳様式

ATCC66系統のRNA4では、Russian系統のRNA4の1番目の翻訳開始コドンの3塩基上流(以下、-3位)および4塩基上流(以下、-4位)の両A残基が欠失している。そこでこれらの部位を突然変異のhot spotと考え、そこに種々の塩基置換を導入し、外被蛋白質翻訳に及ぼす影響をin vitro蛋白質合成系において調べた(図39と図40)。いずれの区でも分子量の大きい蛋白質(以下、CP1)と小さい蛋白質(以下、

CP2)が検出された。CP1は1番目の開始コドン、CP2は2番目の開始コドンから翻訳されたものであることが前の実験から分かっているので、 $CP1/(CP1+CP2)$ を求めることによって1番目の翻訳開始コドンの翻訳活性とした。各転写RNAの翻訳活性を調べた結果、-4位が同じであった場合、-3位はA、G、CおよびUの順に翻訳活性が減少した。とくに-3位がUの場合、活性の顕著な低下がみられた。また、-3位が同じであった場合、-4位はCのとき最も翻訳活性が高く、次にAでG、Uの場合はいずれも同程度に活性が低かった。以上の結果、-3位はU、-4位はGあるいはUの場合、翻訳活性が最も低下した。確かに、F4は(AA)配列の欠失によって-3位、-4位がいずれもUになっていたが、F4UUのみならずここで供試したいずれの置換変異体もF4と同程度の活性の低下はみられなかった。

#### ③5'端非翻訳領域に連続した2塩基の欠失を持つRNA4における外被蛋白質の翻訳様式

ATCC66系統のRNA4とRussian系統のRNA4の5'非翻訳領域の違いは、(AA)配列の欠失によって-3位あるいは-4位の塩基が変わること以外に、そのような欠失によってRNA4の5'端のキャップ構造から1番目の開始コドンまでの距離が短くなることによることも考えられた。そこで、RNA4の5'端に連続した2塩基の欠失を持つ種々の変異RNA4を合成し、外被蛋白質翻訳に及ぼす影響をin vitro蛋白質合成系において調べた(図41)。2塩基の欠失によっていずれの変異体も1番目の翻訳開始コドンからの翻訳活性が低下した。さらに、その翻訳活性の程度は、欠失によって-3位と-4位にあらずにシフトする塩基の種類によって影響を受け、その塩基特異性は、前述の置換変異体を用いた実験で得られた結果と一致した。F4D1とF4はそれぞれ-2位がAおよびUである以外は全く同じ配列を持っている。したがって、F4D1よりもF4の方がさらに活性が低かったことから-2位も翻訳活性に影響を及ぼすことが分かった。

#### ④1番目の翻訳開始コドンのAを含めた4塩基下流(+4位)に種々の塩基置換をもつRNA4における外被蛋白質の翻訳様式

BMVにコードされた4種の蛋白質の翻訳開始コドンの下流の塩基配列はいずれもAUGUCとなっている。Kozakによれば真核生物型の翻訳開始コドンのAを含めた4塩基下流(以下、+4位)は、Gのものが最も多い<sup>64)</sup>。ここでは外被蛋白質を例にとり、+4位に種々の変異をもつRNA4を合成し、*in vitro*蛋白質合成系における外被蛋白質翻訳に及ぼす影響を調べた(図42)。その結果、5'端非翻訳領域に(AA)配列を持つ場合も持たない場合もいずれにおいてもGで活性が最も高く、以下A、U、Cの順に翻訳活性が減少した。

### 3. BMV RNA4の5'端領域の塩基配列と外被蛋白質の翻訳

#### 1) BMV 4系統のRNA4の5'端領域の塩基配列の決定

BMV ATCC PV47系統、ATCC PV178系統およびATCC PV180系統はいずれも塩基配列が決定されていない。しかし、ATCC66系統とRussian系統の比較からも分かるようにBMVは系統間のホモロジーが高いと考えられた。そこで、上述3系統のRNA4の5'端領域の塩基配列の決定には、ATCC66系統で用いた同じプライマーB5と、あらたに2番目の翻訳開始コドンを読むために合成したプライマーB6を用いた。その結果、PV47、PV178およびPV180のRNA4の5'端非翻訳配列の塩基配列は、それぞれ[5'GUAUUAUAAUG3']、[5'GUAUUAUAAUG3']および[5'GUAUUAGUAAUG]であった(図43)。すなわち、PV47、PV178はいずれもRussian系統と同じ配列を持っており、PV180は1番目の翻訳開始コドンの3塩基上流がGであった。また、プライマーB6によって4系統すべてのRNA4の5'端付近に2個の翻訳開始コドンが認められた。

#### 2) BMV 4系統のRNA4の5'端領域の塩基配列と外被蛋白質の発現様式

*In vitro*翻訳実験の結果、RNA4の1番目の翻訳開始コドンの3塩基上流の塩基はAよりもGの方が翻訳活性をわずかに低下させることが分かった。そこでこの部位がGであったATCC PV180系統について外被蛋白質を解析した。第II章の図 よりも

1 レーンにロードするサンプル量を増加させ、ウイルス粒子を構成する外被蛋白質をSDS-PAGEによって分析した。その結果、明らかにPV180の区で主要な外被蛋白質よりも低分子量の蛋白質のバンドが新しく認められ、PV47とPV178でもごくわずかに低分子量の蛋白質が検出された(図44)。

## 考 察

前章で、粒子が一種類の外被蛋白質から構成されているBMV Russian系統と、二種類から構成されているATCC66系統の全塩基配列を比較した結果、ATCC66系統ではRNA4の5' 端非翻訳領域に(AA)配列の欠失が見られた。この5' 端非翻訳領域は外被蛋白質の翻訳開始に関与するリーダー配列であるとともに、RNA4の転写開始プロモーターの一部でもある(図28)<sup>39, 76)</sup>。そこでATCC66系統のRNA3中のRNA4配列に相当する5' 端非翻訳領域に(AA)配列を復帰させ、その領域に関してのみRussian系統と同一の構造にした。(AA)配列を付加したATCC66系統のRNA3とATCC66系統のRNA3をそれぞれRNA1およびRNA2と混合し、オオムギのプロトプラストあるいは植物体に接種した結果、いずれの実験においても、RNA3に(AA)配列を付加しなかった場合は2種類の外被蛋白質が検出され、その(AA)配列をもっている場合は1種類の外被蛋白質が検出された。一方、(AA)配列の有無はRNA4の感染細胞内における合成量にも、粒子に包み込まれる量にも全く影響を及ぼさなかった。また、RNA4の5' 端非翻訳領域はinternalプロモーターの機能の中でも、とくにRNA4の転写を正確に行うのに関与していると報告されている<sup>76)</sup>が、本実験から明らかなように(AA)配列の復帰によって新たな分子量のRNA4が転写されるようなことはなかった。以上の結果から、ATCC66系統で2種類の外被蛋白質が検出されたのは、RNA3中のRNA4配列に相当する5' 端非翻訳領域から(AA)配列が欠失したことが原因であることが分かり、また、その生成機構はマイナス鎖のRNA3からのRNA4の転写ではなく、RNA4からの翻訳レベルにあることが明きらかとなった。

RNA4配列中の5' 端非翻訳領域に(AA)配列をもつRNA3とまたないRNA3を接種した

区から得られたウイルス粒子の収量はほとんど同じであり、そのウイルス粒子中のRNAの塩基配列を調べたところ、いずれの区においてもその配列は保存されていた。一方、本実験は、一個体の植物での増殖であったが、BMVが一細胞で $10^6$ 以上増殖することを考えた場合、その増殖回数は決して少なくない<sup>106)</sup>。したがって、感染性やウイルスの収量にあまり大きな影響を与えない変異を、積極的に集団内で固定していくような選択圧は働かなかったと考えられる。しかし、(AA)配列をもつウイルスともたないウイルスを等モル数混合し、いくつかの系統を設け、増殖を何度も繰り返すことによって、一方のウイルスに収斂していくかどうかという問題は、BMVの系統間の進化の問題および外被蛋白質の生物活性という点からも興味深い。

外被蛋白質遺伝子のC端付近にFrame shift変異を持ち、その結果翻訳停止コドンが早く現われるようにしたRNA3をRNA1およびRNA2と混合し、オオムギプロトプラストに接種した結果、もとのRNA3を接種した場合よりも分子量は小さいが、2種類の外被蛋白質が検出された。仮に2種類の外被蛋白質が、同じ部位から翻訳を開始し、異なる部位で停止した結果の産物ならば、C端を短くした変異体の場合は1種類の短い外被蛋白質しか検出されないはずである。したがって、ATCC66系統の2種類の外被蛋白質は少なくとも異なる部位から翻訳が開始された結果生じることが明かとなった。ATCC66系統のRNA4の塩基配列を調べると、1番目の翻訳開始コードンの21塩基下流に同じ読み枠で2番目の翻訳開始コドンが認められた。これら2種の開始コドンから翻訳される蛋白質の分子量を推定したところSDS-PAGEから得られた2種類のバンドと分子量が一致したので、これらの開始コドンがATCC66系統で見られる2種類の外被蛋白質の翻訳開始シグナルであると考えられた。

一般的に真核生物のmRNAでは、単一の翻訳可能領域(open reading frame、以下ORF)をもち、5'端に最も近い翻訳開始コドン(AUG)から単一の蛋白質が翻訳される<sup>65)</sup>。しかし、いくつかの動物ウイルスでは、一本のウイルスRNA上の2個の翻訳開始コドンから2種類の蛋白質が翻訳される例が知られている。それらは、同じORFから翻訳されるものと、異なるORFから翻訳されるものに分けられるが、このような真核生物における例外的な翻訳様式にKozakは、“leaky scanning”モデルを提

案した<sup>65)</sup>。これは、真核型リボゾームの40SサブユニットがmRNAの5'端からスライドし、まず、1番目のAUGならびにその周りの配列を認識し停止した後、60Sサブユニットが結合し蛋白質合成が開始されるという、真核生物の翻訳開始に関するscanningモデルに基づくものである。2種類の蛋白質が翻訳される場合は、1番目のAUGにおける40Sサブユニットの停止効率が悪いことから"leaky"に2番目のAUGまで40Sサブユニットがスライドし、そこから第二の蛋白質合成が開始されるとする説である。一方、Kozakは真核生物型の多くのmRNAの翻訳開始シグナルの近傍の塩基配列を統計的に調べることによって、ANNAUGNまたはGNNAUGPu(Nは任意の塩基、PuはAまたはGをあらわす)の配列を持ったものが最も利用効率が高く、これがscanningモデルにおける40Sサブユニット移動の停止シグナルとして機能すると考えた<sup>64)</sup>。さらにKozakは、プレプロインスリン遺伝子の翻訳開始コドンの周辺の塩基を系統的に1塩基ずつ置換することによって、(CC)ACCAUGGが最も強い開始シグナルになることを示した<sup>67)</sup>。

BMV ATCC66系統のRNA4についても上述のモデルが当てはまるかどうかを詳細に調べるために、in vitroでRNA4を合成する系を確立した。得られたRNA4をin vitro蛋白質翻訳系に加えた結果、in vivoと全く同様に、RNA4の5'端非翻訳領域に(AA)配列がある場合はほとんど1種類、その配列が無い場合は完全に2種類の外被蛋白質が合成された。この系は、in vivoにおけるようなRNA3のマイナス鎖からのRNA4の転写という過程を経ないので、得られたデータがin vivoの外被蛋白質遺伝子の発現全体を正しく反映しない可能性も考えられるが、純粋にRNA4からの外被蛋白質の翻訳を解析できるという利点を持つと考えられる。

5'端非翻訳領域に(AA)配列を持つRNA4と持たないRNA4の両方について、1番目の開始コドンのすぐ下流にFrame shift変異を導入し、蛋白質合成がすぐに停止するようにすると、いずれの場合も分子量の小さい蛋白質のみが合成された。このことは、2番目のAUGも翻訳開始コドンとして機能し得ること、さらに(AA)配列をもたないRNA4で検出された2種類の蛋白質は、1番目のAUGと2番目のAUGから翻訳されたものであることを示している。

BMV Russian系統型の5'端非翻訳領域をもつRNA4の1番目の翻訳開始コドンの周

逆に種々の変異を導入し、in vitro蛋白質合成系に加え得られた結果を“leaky scanning”モデルに当てはめると、ATCC66系統において2種類の外被蛋白質が検出された原因として次のことが考えられる。すなわち、(AA)配列の欠失によって1番目のAUGの-3位の塩基がUになり、40Sサブユニットの停止効率が悪くなり、一部が2番目のAUGにスライドし、そこからも外被蛋白質を合成した。その際、1番目のAUGの+4位の塩基がGであれば、比較的停止効率の低下をカバーできたが、Uであったために停止効率の低下が著しくなり、ウイルス粒子中の外被蛋白質が2種類検出されるという表現型となって現われた。

また、(AA)配列の欠失によって、-3位の塩基置換が引き起こされ、同時に5'端非翻訳領域の長さが短くなった。Kozakによれば5'端非翻訳領域は長さそのもので翻訳効率は決まらないが、長い配列中に過度の2次構造が存在すると活性の低下をもたらすとした<sup>68)</sup>。一方、BMV RNA3においては、5'端の91塩基の非翻訳配列が2次構造をとることによって、5'端のキャップ構造と開始コドンが接近し、リボゾームの結合と翻訳の開始を効率よく連携させているというモデルが提出された<sup>1)</sup>。逆に5'端非翻訳領域が短か過ぎる例としては、免疫グロブリンのmRNAが知られている。このRNAはキャップ構造の3塩基下流に1番目のAUGが存在し、その12塩基下流に同じ読み枠で2番目のAUGが存在し、いずれのAUGからも翻訳が行われる。すなわち、5'非翻訳領域が3塩基しかないために1番目のAUGの翻訳開始効率が低下し、2番目のAUGからも翻訳が開始されるものと考えられた<sup>62)</sup>。BMVにおいては1番目のAUGの-1位から-5位までの塩基が保存されていてもその上流の2塩基が欠失しただけで翻訳効率の低下がみられた(図41、クローンF4D4)。したがって、5'端非翻訳領域が(AA)配列の欠失によって9塩基から7塩基になったことも、1番目のAUGの翻訳活性の低下の原因の一部になったと考えられる。

BMVの粒子は、単一の外被蛋白質を含むとされてきた<sup>73)</sup>。しかし、本実験でATCC66系統の粒子から2種類の外被蛋白質が検出され、それらはRNA4の5'端付近の2個の翻訳開始コドンから合成されたものであることが分かった。BMVの他の3系統についてもRNA4の5'端付近の塩基配列を調べた結果、2個の翻訳開始コドンが認められた。In vitro翻訳実験でも明らかなように、検出感度を上げることによって、



-3位がAの場合でも2種類の外被蛋白質を検出できると考え、1レーンにロードする蛋白質量を増加させたところ-3位がGのATCC PV180系統をはじめ、-3位がAのATCC PV47系統およびATCC PV178系統においても、わずかながら分子量の小さい第二の外被蛋白質が検出された。また最近、Russian系統においても分子量の小さい外被蛋白質がウイルス粒子を構成する全蛋白質の約4%含まれていることが報告された<sup>106)</sup>。今まで真核生物型のmRNAで2種類の蛋白質が近接するAUGより翻訳される例は、動物ウイルスに限られており、細胞のmRNAでは検出されなかった<sup>66)</sup>。それぞれのウイルスで報告されてきた2種類の蛋白質もウイルス核酸の塩基配列に基づいて研究者が予測して初めて検出されたものである。したがって今後、細胞のmRNAはもとより、植物ウイルスにおいても塩基配列が明らかになるにしたがって、さらに多くの第二の蛋白質が発見される可能性は大きい。

植物ウイルスでここでのBMVと同様の様式で2種類の蛋白質が翻訳されるという報告は、BSMVの非構造蛋白質である $\beta b$ 蛋白質である<sup>94)</sup>。すなわち $\beta b$ 蛋白質に対する抗体によってBSMV感染葉から新たに分子量の小さい第二の蛋白質が検出され $\beta b'$ とされた。 $\beta b'$ は同じ読み枠で $\beta b$ よりも35アミノ酸残基分だけ分子量が小さいが、in vitro突然変異によって $\beta b'$ だけを発現するような変異RNAを調製し、野性型と比較した結果、生物活性は全く同じであった。本実験においても、BMV ATCC66系統で2種の外被蛋白質を発現するウイルスと1種の外被蛋白質を発現するウイルスとの間に感染性の差は認められず、また最近、BMV Russian系統においては分子量の小さい外被蛋白質だけを発現するようなウイルスでも野性型と同様の感染性を持つことが報告された<sup>106)</sup>。

BMVにおいてはin vitro実験によって、少なくとも外被蛋白質のN端から8~25アミノ酸の領域がウイルスRNAと相互作用するという報告がある<sup>110)</sup>。したがって、ATCC66系統で検出された分子量の小さい外被蛋白質は最初の8アミノ酸が欠失したものであると強く示唆されたこと、さらにそれらがウイルス粒子の構成成分になり得るということは上述のin vitro実験の結果を支持すると考えられる。BSMVとBMVいずれのウイルスについても、ウイルスの感染性に必要の無い配列がなぜ保存されているのかは単なる進化の途中段階であるとも、淘汰圧のかからない塩基配

列が必ずしもはやく変異するとは限らないとも考えられる<sup>121)</sup>。今後、BMVにおいてさらに粒子の安定性<sup>114)</sup>など別の生物活性について調べることによって、その疑問に答えることができるかもしれない。



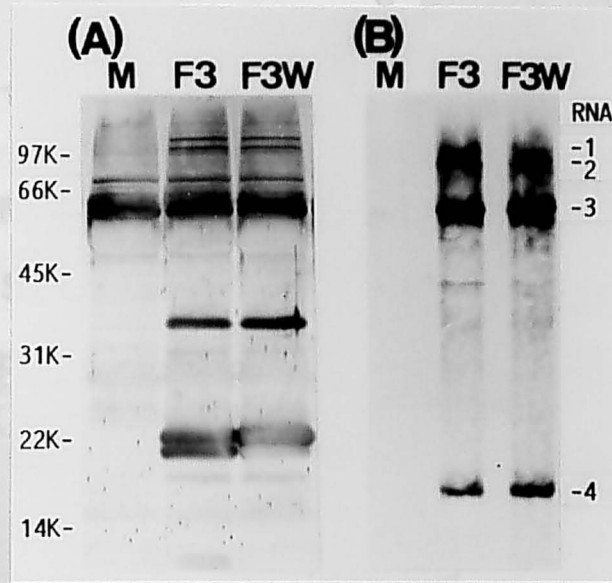


図32. BMV RNA3の変異体RNAを接種したオオムギプロトプラストにおけるウイルス蛋白質のウェスタンブロッティング分析(A)とウイルスRNAの $^3\text{H}$ ラベルによる分析  
ウイルス蛋白質の分析には、F3およびF3WをそれぞれF1+F2と混合して接種し、接種24時間後に回収しSDS-12.5%PAGE後、1a、2a、3aおよび外被蛋白質それぞれに対する抗体を混合して用い免疫学的に検出した。ウイルスRNAの分析には、(A)と同様に接種し、接種24時間後から3時間、 $20\text{ }\mu\text{g/ml}$ のアクチノマイシンD存在下で $10\text{ }\mu\text{Ci/ml}$ の $^3\text{H}$ ウリジンでRNAをパルスラベルした。レーンM: モック接種区

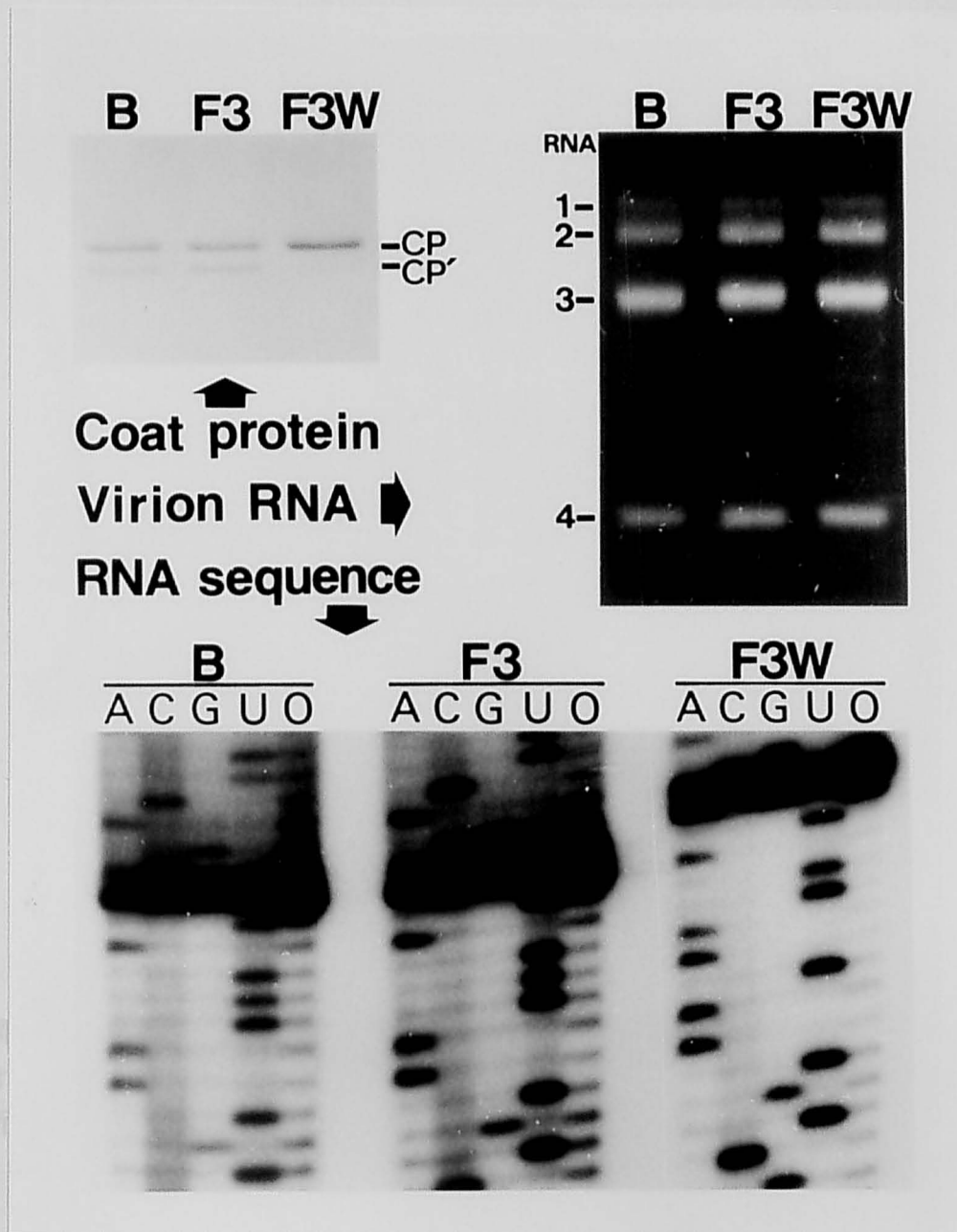


図33. BMV RNA3の変異体RNAを接種したオオムギから調製したウイルス粒子における外被蛋白質のSDS-PAGE分析、ウイルスRNAのアガロースゲル電気泳動分析およびRNA3(あるいはRNA4)中の外被蛋白質の翻訳開始コドン周辺のシーケンス分析

CPおよびCP'は図1のBMV ATCC66系統にみられた2種類の外被蛋白質の泳動位置を示す。RNAの塩基配列決定は図27と同様に行った。 B: BMV-ATCC66系統のRNA接種区、F3: F1+F2+F3接種区、F3W: F1+F2+F3W接種区

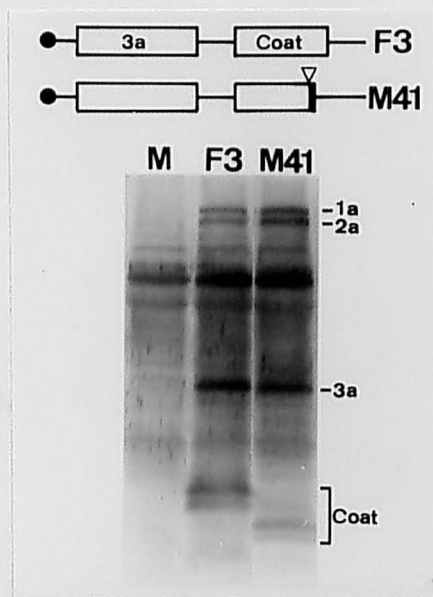


図34. 外被蛋白質遺伝子のC端付近にframe shift変異を持つRNA3(M41)を接種したオオムギプロトプラストにおけるウイルス蛋白質のウェスタンプロッティング分析とRNA3中でframe shift変異の起こった部位を表す模式図

F3およびM41をそれぞれF1+F2と混合して接種し、図32と同様に分析した。

▽: frame shift変異の起こった部位、■: frame shift変異によって読み枠が変わったペプチド配列、1a: 1a蛋白質、2a: 2a蛋白質、3a: 3a蛋白質、Coat: 外被蛋白質

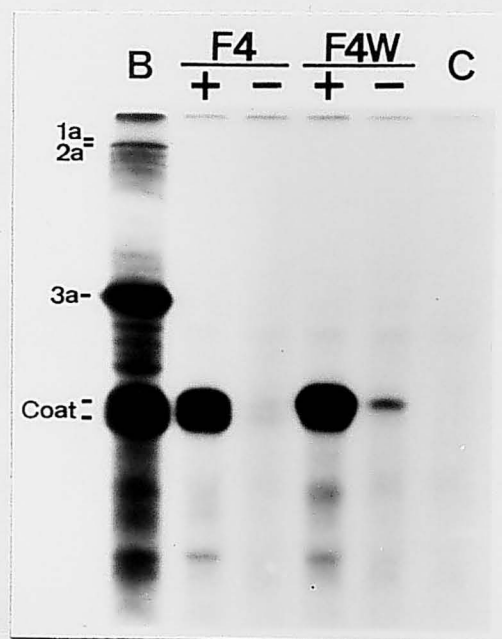


図35. *In vitro*転写産物の5'端へのキャップ構造の付加が*in vitro*翻訳活性に及ぼす影響を示すフルオログラフ

*In vitro*転写系において、キャップアナログ( $m^7GpppG$ )存在下(+)あるいは非存在下(-)で合成したF4およびF4WまたはBMV-ATCC66系統のRNA(B)およびDDW(C)を用い、 $[^3H]$ -ロイシンを基質とし、コムギ胚芽抽出液で*in vitro*翻訳を行った。SDS-15% PAGEの後、ENLIGHTNING<sup>TM</sup>で処理し、フルオログラフィーを行った。1a: 1a蛋白質、2a: 2a蛋白質、3a: 3a蛋白質、Coat: 外被蛋白質

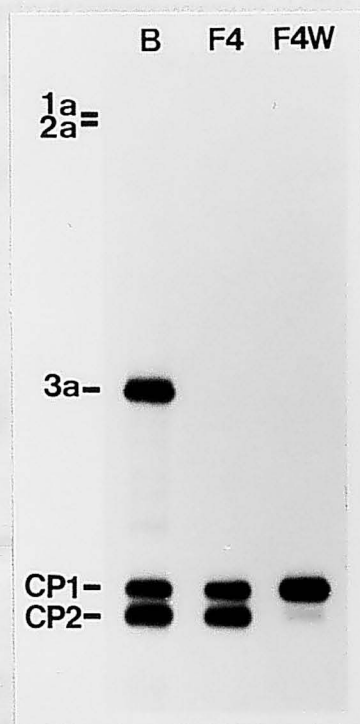


図36. RNA4の5'端非翻訳領域への(AA)配列の付加がRNA4のin vitro 翻訳に及ぼす影響を示すフルオログラフ

In vitro転写系において、キャップアナログ( $m^7GpppG$ )存在下で合成したF4およびF4WまたはBMV-ATCC66系統のRNA(B)を用い、図35と同様にin vitro翻訳およびフルオログラフィーを行った。

1a: 1a蛋白質、2a: 2a蛋白質、3a: 3a蛋白質、CP: 外被蛋白質(分子量の大きいものをCP1、小さいものをCP2とした。)



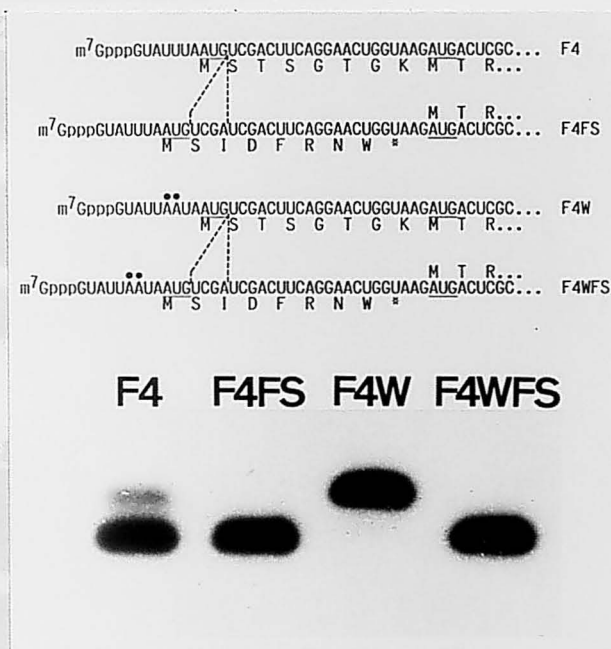


図37. 外被蛋白質遺伝子の1番目の翻訳開始コドンのすぐ下流にframe shift変異を持つRNA4(F4FSとF4WFS)を用いたin vitro翻訳分析を示すフルオログラフと変異体RNA4の5'端領域の塩基配列およびコードされたポリペプチドのアミノ酸配列

図36と同様にin vitro翻訳およびフルオログラフィーを行った。●●のついたAAはBMV(ATCC66系統)のRNA4の5'端非翻訳領域で欠失している(AA)配列を表す。下線で示した外被蛋白質遺伝子の1番目と2番目の翻訳開始コドンから合成されるポリペプチドのアミノ酸配列はそれぞれ塩基配列の上部と下部に示した。  
\*はframe shift変異によって新たに生ずる翻訳停止コドンを表わす。

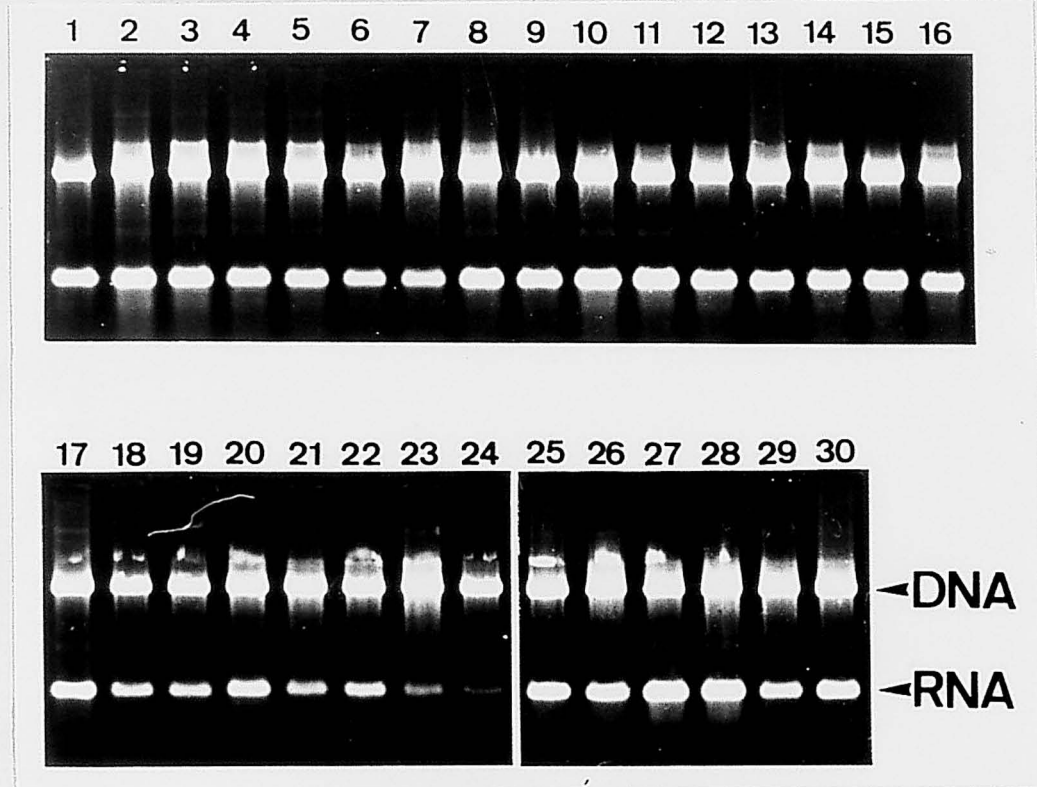


図38. 外被蛋白質遺伝子の1番目の翻訳開始コドンの近傍に種々の変異をもつRNA 4のin vitroにおける転写効率のアガロースゲル電気泳動による分析

泳動度の小さいものはEcoRIで処理し直鎖化したプラスミドDNA、大きいものはそれらDNAからの転写産物を表わす。各レーンに泳動された転写産物を以下に示す。 8,13,30: F4、1,9,17,25: F4W、2: F4AC、3: F4AG、4: F4AU、5: F4CA、6: F4GA、7: F4UA、10: F4WA1、11: F4WC1、12: F4WG1、14: F4A1、15: F4C1、16: F4G1、18: F4CG、19: F4CU、20: F4GG、21: F4GU、22: F4UC、23: F4UG、24: F4UU、26: F4D1、27: F4D2、28: F4D3および29: F4D4

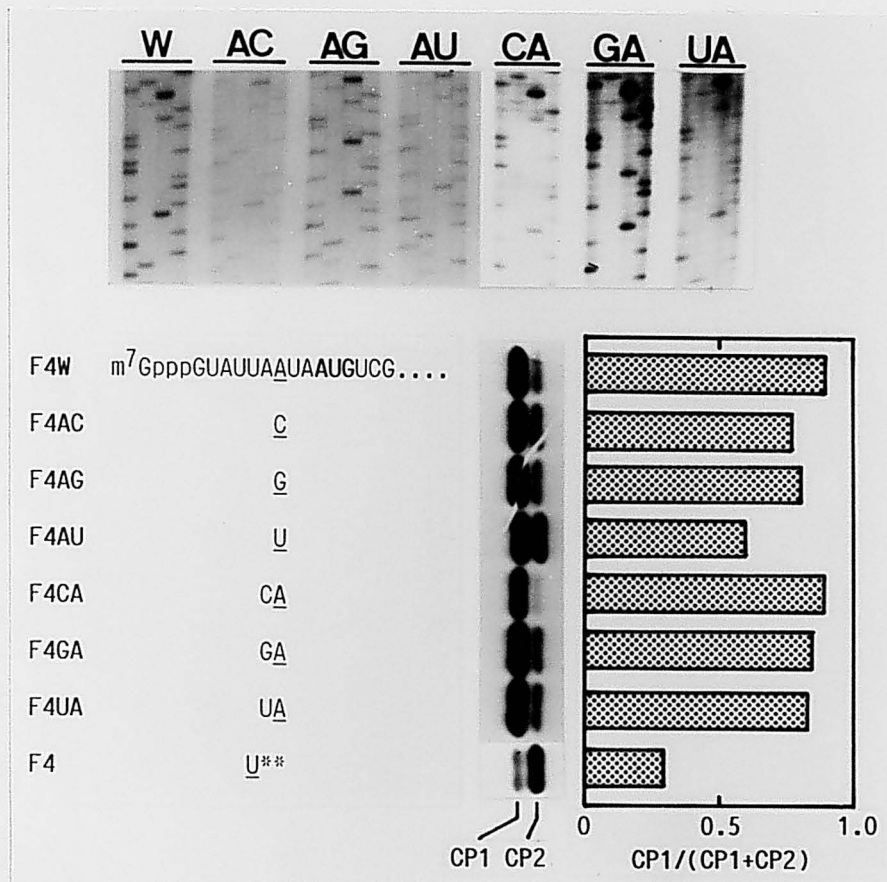


図39. BMV-Russian系統型RNA4(F4W)の外被蛋白質遺伝子の1番目の翻訳開始コドンの3塩基または4塩基上流に変異をもつRNA4の*in vitro*翻訳分析を示すフルオログラフ  
フルオログラフの左には各変異体RNA4の5'端領域の塩基配列の内、F4Wと異なる塩基またはAUGの3塩基上流の塩基(下線)のみを示した。\*はF4Wと比較して欠失した塩基、太字はRNA4の外被蛋白質遺伝子の1番目の翻訳開始コドンを表わす。右には、全翻訳産物に占めるCP1(外被蛋白質の内、分子量の大きいもの)の割合を示した。翻訳産物の相対値はフルオログラフのそれぞれのバンドに対応する乾燥ゲル部分を切抜き、液シンでカウントを測定して求めた。上部には、各変異体RNA4転写物の鋳型DNAの塩基配列を示すオートラジオグラムを示した。各クローンともに左からDNA配列のA、C、GおよびTを表し、下がT7プロモーター領域、上がRNA4のcDNA領域の塩基配列を表す。

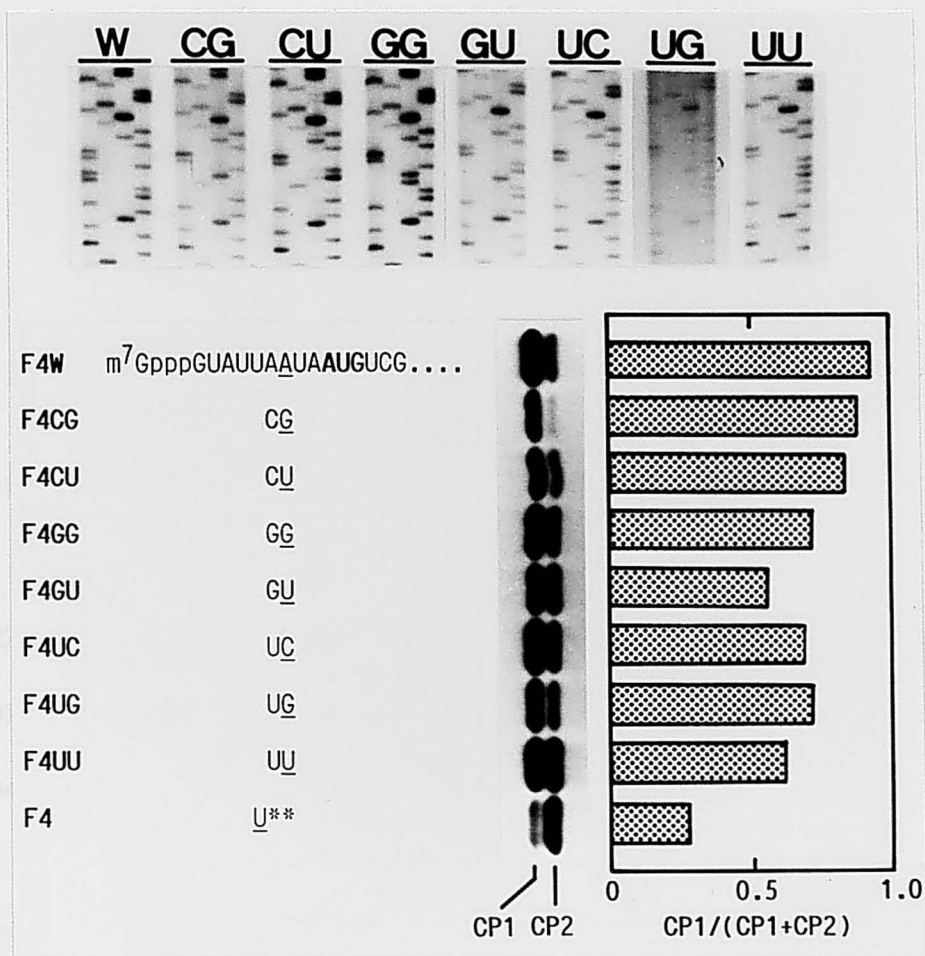


図40. BMV-Russian系統型RNA4(F4W)の外被蛋白質遺伝子の1番目の翻訳開始コドンの3塩基と4塩基上流に変異をもつRNA4の*in vitro*翻訳分析を示すフルオログラフ  
図39と全く同様に示した。



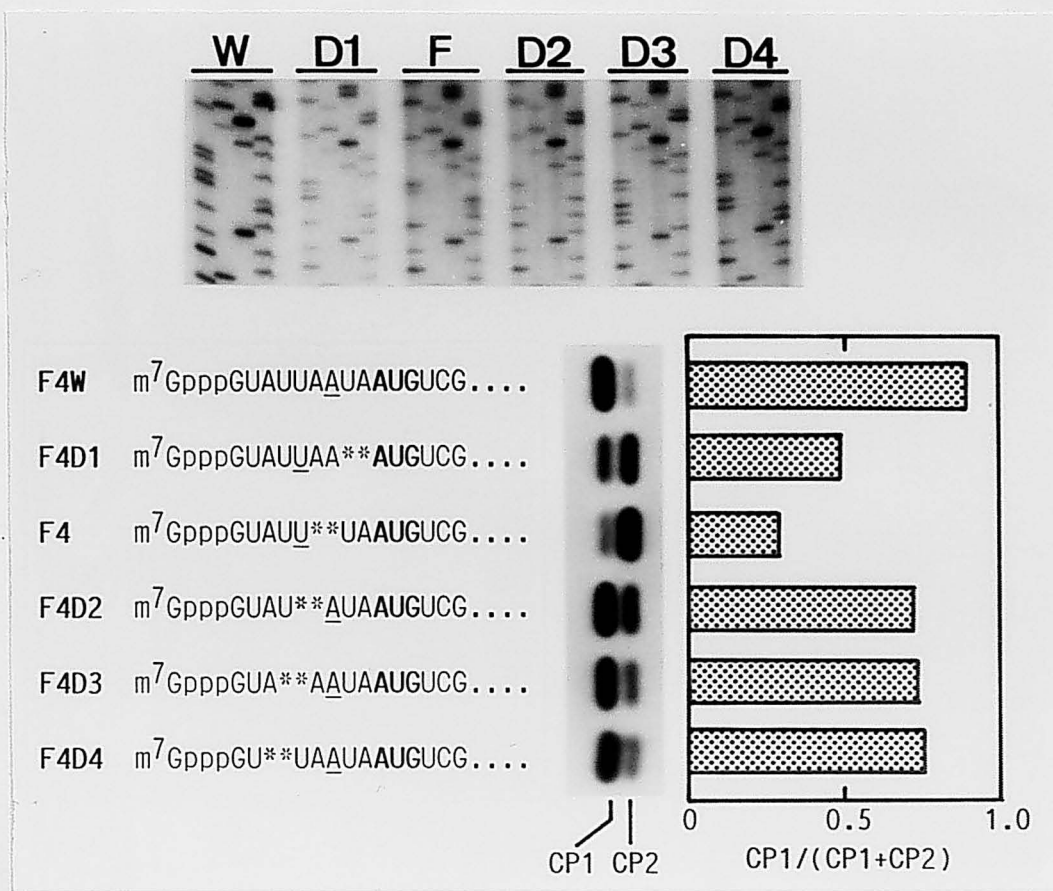


図41. BMV-Russian系統型RNA4 (F4W)の5'端非翻訳領域中の連続した2塩基が欠失したRNA4の*in vitro*翻訳分析を示すフルオログラフ  
各変異体RNA4の5'端領域の塩基配列を全て表した以外は図39と全く同様に示した。

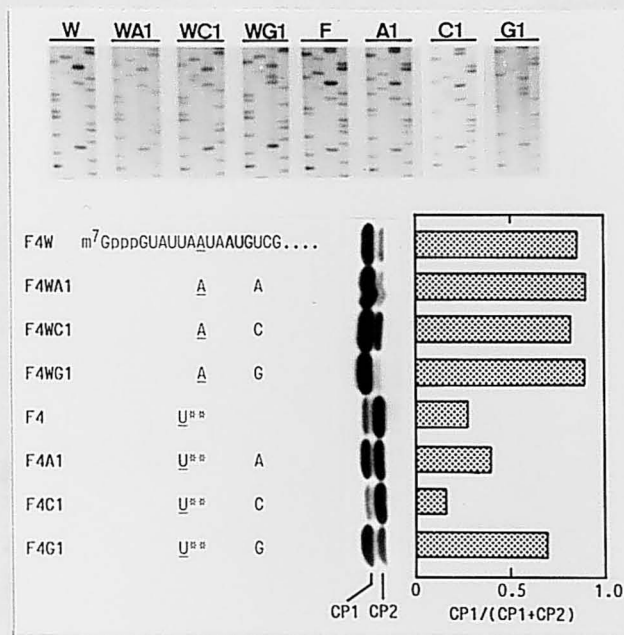


図42. BMV-Russian系統型RNA4(F4W)あるいはATCC66系統型RNA4(F4)の外被蛋白質遺伝子の1番目の翻訳開始コドンのAを含む4塩基下流に変異をもつRNA4のin vitro翻訳分析を示すフルオログラフ

図39と全く同様に示した。

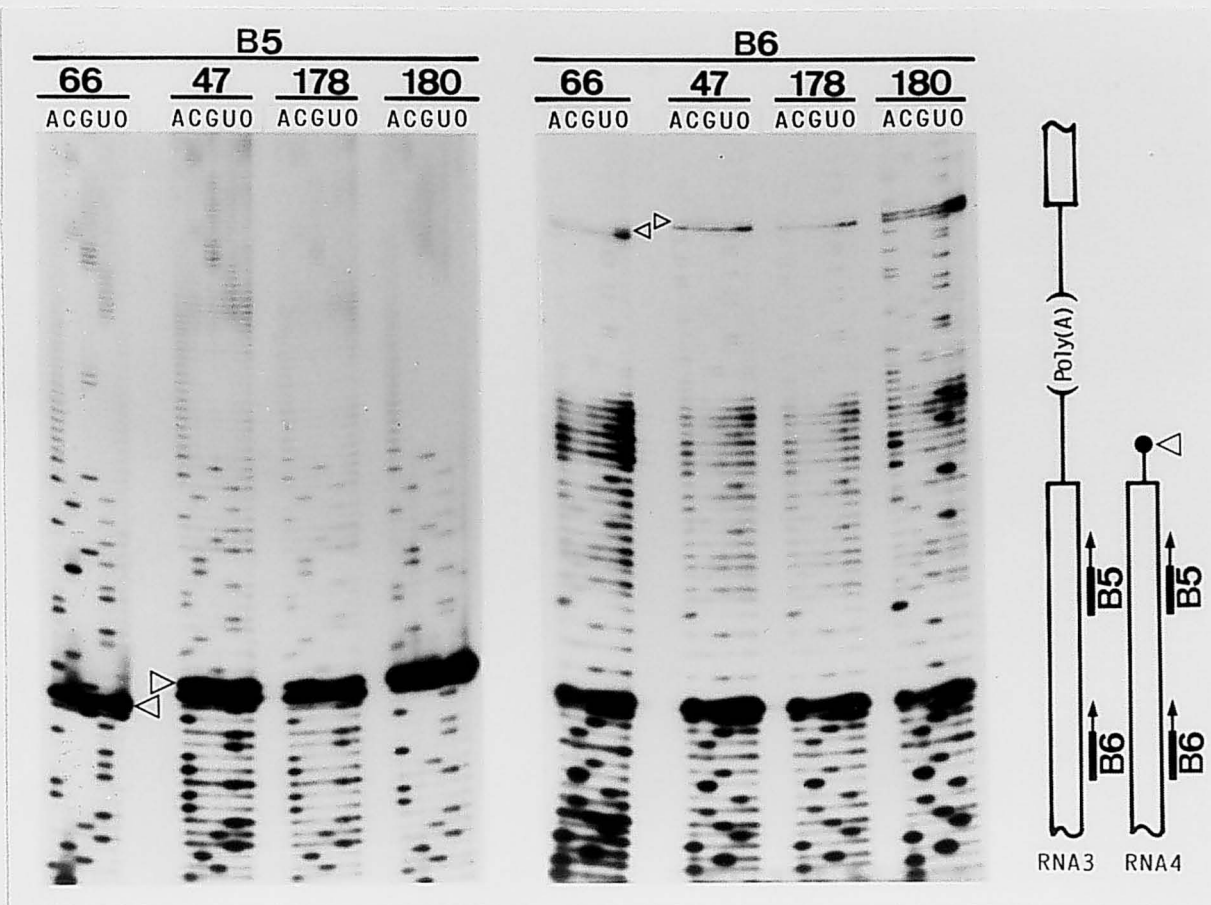


図43. BMV-ATCC66系統、ATCC PV47系統、ATCC PV178系統およびATCC PV180系統のRNA4の5'端領域からRNA3のintercistronic領域までの塩基配列分析を示す7.5%ポリアクリルアミドシークエンスゲルのオートラジオグラムとRNAの塩基配列決定に用いたプライマーの反応の方向を示す模式図

RNAの塩基配列は、図23と同様にして決定した。RNA3の塩基番号1274～1288 (B5)および塩基番号1324～1338(B6)に相補的なオリゴヌクレオチドの5'端を $^{32}\text{P}$ でラベルしたものをプライマーとし、各ウイルスで未分画のRNAを鋳型として用いた。▷はRNA4の5'端のキャップ構造(●)における強いストップシグナルをあらわす。——→: RNAシークエンス用のプライマーとcDNA合成の方向



## 第VI章. 総合考察

StanleyによるBMVの結晶化<sup>1)</sup>は、結晶化剤として用いた尿素と考慮されていたウイルスが解離化される<sup>2)</sup>という報告がある。このため、BMVの研究が進行するにつれて、ウイルス粒子の構造と関係する

出発点とな

ると報告し

すなわち

逆転写酵素

TMVやBMVなど

ある外被蛋白

ると考えられ

しかし、最

アルファルブ

の別は、

また、

白質

被蛋白

は、

から

ある

である

ウイルス

ない

ための

統を用

なむこ

す外被

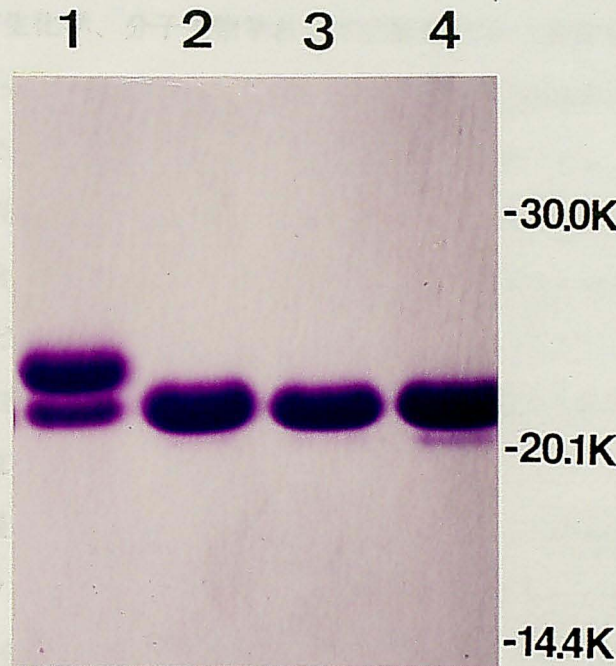


図44. BMVの外被蛋白質のSDS-PAGE分析

レーン1: ATCC66系統、2. ATCC PV47系統、3: ATCC PV178系統、および4: ATCC PV180系統. 各ウイルスともに1レーンに30 $\mu$ gのウイルス粒子をロードした。分子量マーカーは、30.0K(ウシ赤血球カルボニックアンヒドラーゼ、20.1K(ダイズトリプシンインヒビター)、14.4K(卵白リゾチーム)を用いた。



## 第VI章. 総合考察

StanleyによるTMVの結晶化<sup>117)</sup>は、感染性病原体であり超微小生物と考えられていたウイルスが結晶化され得るような化学物質であることを証明し、のちにTMVの研究が生化学、分子生物学および生物物理学の分野で先導的な役割を果たす出発点となった。発表当時Stanleyは、結晶は自己触媒能を持つ巨大な蛋白質であると報告したが、それはTMVのRNA含量が約5%と低かったことによると思われる。すなわちTMVは、他の大部分の植物ウイルスと同様にRNAと蛋白質のみからなり、遺伝情報を含んだRNAの約20倍もの質量の蛋白質がRNAと複合体を形成している。TMVやBMVなどのプラスセンスの一本鎖RNAウイルスではウイルス粒子の構成成分である外被蛋白質は、その機能は文字通り粒子の外側を被いRNAを保護することであると考えられてきた。

しかし、最近、外被蛋白質は様々な機能を持つことが明きらかになってきた。アルファルファモザイクウイルス(AlMV)では、ウイルスの外被蛋白質がウイルスのRNA複製に必須であることが明らかにされ<sup>87)</sup>、さらに外被蛋白質がAlMVの*in vitro* RNA合成を阻害したという報告もある<sup>55, 56)</sup>。一方、BMVにおいても外被蛋白質がBMVの*in vitro* RNA合成を阻害し、その阻害作用はBMV RNAの3'端領域を外被蛋白質とRNA複製酵素が競合することに起因することが示唆された<sup>52, 53)</sup>。また、TakamatsuらはTMVの外被蛋白質はウイルスの細胞間移行には必要でないが、感染葉から非感染葉への遠隔移行に必須であることを示した<sup>118)</sup>。それに対してcowpea mosaic virusではウイルスの細胞間移行に、58Kあるいはそのプロセシング産物である48Kの非構造蛋白質のほかに外被蛋白質も必要であることが示された<sup>125)</sup>。

ウイルスにコードされたそれぞれの蛋白質がいくつかの機能をもつことは、少ない遺伝情報しかもっていないウイルスにとっては、その情報を効率的に用いるための重要な性質であると考えられる。当研究室では、1973年からBMV ATCC66系統を用いてきたが、最近になってウイルス粒子が、2種類の分子量の外被蛋白質を含むことが明きらかとなった。本研究では、上述のように機能の面で多様性を示す外被蛋白質が発現においても多様性を示したことに興味を持ち、そのような多

様性が生じる機構を分子レベルで、おもに翻訳過程に関して詳細に解析した。

逆転写酵素の発見<sup>120)</sup>によってRNAからcDNAが作られ、RNAウイルスにもDNA組換え技術が適用できるようになった。感染性をもつ全長cDNAはまず最初にポリオウイルス<sup>100)</sup>やバクテリオファージQ $\beta$ <sup>119)</sup>で報告され、それらはcDNAのままで感染性を示した。その後、試験管内でDNAからRNAを転写する系が確立されてからは、最初にBMV<sup>6,7)</sup>において、さらにポリオウイルス<sup>60)</sup>において感染性のある *in vitro* 転写RNAを調製する系がつくられ、その後プラス鎖の植物RNAウイルスではほとんどのグループで同様の系ができつつある。本研究ではBMV ATCC66系統の外被蛋白質の発現機構の解析を行うために、本ウイルスについて試験管内BMV RNA合成系を作製することを試みた。その結果、ATCC66系統の性質を完全に備えたRNAを転写できるような全長cDNAをクローニングすることができた。

この系によって、RNAウイルスの遺伝子操作がcDNAレベルで可能となり、従来DNA組換え技術を用いて*in vitro*において組換えRNAを構築することができるようになった。現在までに種々のウイルスで数多くの変異体ウイルスが*in vitro*で作られ、ウイルス遺伝子の構造と機能に関する情報が急激な勢いで蓄積されてきた。また、このような系を用いることによって、BMVのような分節ゲノム構造を持つウイルスの場合、従来のゲル電気泳動では分離できなかった分子量の近い各分節ゲノムをcDNAを経由して個別に合成し、分離することができるようになった。この利点を利用することによって、BMVの複製にはRNA3は関与せず、RNA1とRNA2の両RNAのみで充分であることが完全に証明された<sup>37)</sup>。また、プロモウイルス群のBMVとCCMVの間で分節ゲノム間の組換えが行われ、宿主特異性に関わる因子について解析されている<sup>9,11)</sup>。

さらに、この系においてcDNAを転写ベクターに逆方向に挿入したpBBシリーズのベクターを利用することによってマイナス鎖を合成することができ、BMVの完全な複製酵素を純化するbioassay系にも利用できるようになった。すなわち、現在までにBMVで純化されている複製酵素は、プラスの一本鎖RNAを鋳型として、それに相補的なマイナスのRNAを合成し、結果的に二本鎖RNAを合成する<sup>52,74,82,98)</sup>。またRNA3のマイナス鎖からRNA4を合成できる<sup>83)</sup>。しかし、これまでBMVにおいて

はプラス鎖のゲノムRNAから再びプラス鎖のゲノムRNAを合成できる酵素は純化されていない。これは酵素の純化の過程でbioassayの系にウイルスRNAを加え、このRNAを鋳型にできるという性質のみで酵素画分のスクリーニングを行ってきたことにひとつの原因があると考えられる。今後は、cDNAから合成したマイナス鎖もbioassay系に用いることでマイナス鎖を鋳型にできる酵素を純化できるかもしれない。一方、BMVの1a蛋白質と2a蛋白質は、それぞれヘリカーゼ<sup>58)</sup>およびRNA依存ポリメラーゼ<sup>56)</sup>とアミノ酸配列において相同性がみられる。現在までにBMVで純化されている複製酵素には1a、2a両蛋白質ともに含まれているにも関わらず二本鎖RNAで合成が停止していることから<sup>54, 58)</sup>、二本鎖を分離するようなヘリカーゼ活性を阻害するような物質が含まれている可能性も考えられている<sup>48)</sup>。その場合、マイナス鎖の一本鎖RNAからプラス鎖のゲノムRNAが合成されるかどうかは興味ある問題である。

原核生物型のmRNAでは、翻訳開始コドンの5〜9塩基上流に16S rRNAの3'末端領域(-CCUCCUUA<sub>OH</sub>)と相補的なプリンに富んだいわゆるShine-Dalgarno配列がほぼ例外なく存在し、両配列の相互作用が翻訳開始に重要であることが示唆されている<sup>112)</sup>。ところが、真核生物型のmRNAでは、5'端非翻訳配列中に18S rRNAと安定な塩基対を形成するような共通配列を見いだすことはできない。Kozakは、真核生物型の種々のmRNAの開始コドンの近傍の配列を比較した結果、PuXXAUGG(Puはプリン残基、Xは任意の塩基を表わす)をコンセンサス配列として提出した<sup>64)</sup>。本研究でBMVの外被蛋白質のmRNAであるRNA4の5'端非翻訳配列を様々に変異させた結果、Kozakの説を完全に支持するものであった。またそれらの変異のいずれよりもBMV Russian系統のタイプの配列の方が翻訳活性が高かったのは、生物の巧妙さが感じられ興味深い。ATCC66系統タイプの配列が最も翻訳活性が低かったのはいかなる理由によるのかはウイルスの生物活性をも含めて今後の課題であろう。

植物ウイルスでは、植物があるウイルスに感染した結果、そのウイルスと近縁の他のウイルスによる二重感染から保護されるcross protectionという現象が知られている。これは動物におけるワクチン接種と見かけ上はよく似ているが植物には免疫系がないので生化学的には全く異なる現象である。1986年、Beachyらの

グループはTMVの外被蛋白質遺伝子をタバコ植物体に導入し、発現させることによって、TMV抵抗性のタバコを作り出すことに成功した<sup>16)</sup>。この抵抗性はウイルスRNAを接種した際には発現されないことから、細胞内に蓄積した外被蛋白質が後から侵入したウイルスの脱外被を阻害するというメカニズムが考えられた<sup>102)</sup>。これはcross protectionを説明するためのひとつの説であるが、50年以上前に発見されたこの現象が、現在最新の遺伝子組換え技術によってウイルス抵抗性植物の育成という植物バイオテクノロジーに応用されたことは興味深い。

TMVでは外被蛋白質遺伝子に変異を導入すると、TMVが示す本来の病徴とは異なる病徴を示す変異株が得られた<sup>26, 107, 108)</sup>。また、TMVの外被蛋白質が葉緑体のチラコイド膜にある光合成の光化学系IIに関与する画分から検出されたことから、外被蛋白質はこの系を攪乱することによって病徴発現に関わっていると考えられた<sup>51, 103)</sup>。本研究で得られた2種類の外被蛋白質は感染性に関しては差は認められなかったが、それらの外被蛋白質の間に病徴決定に関して差があるのか、すなわち外被蛋白質は病徴を決定する因子のひとつとして機能しているかどうかは、今後検討すべき課題であると考ええる。

## 摘 要

プロモモザイクウイルス(BMV)は、主にイネ科植物を宿主とするRNAウイルスである。BMVのゲノムは3種のプラスセンスすなわちmRNA活性をもつ一本鎖RNAからなり、分子量の大きい方からRNA1、RNA2およびRNA3と呼ばれている。さらにサブゲノムRNAとしてウイルス粒子中に存在するRNA4は、外被蛋白質の情報をもっており、増殖過程においてRNA3のマイナス鎖から合成される。このようなプラスセンスRNAウイルスは、全植物ウイルスの4分の3以上を占め、一部の例外を除けばウイルス粒子は単一種の外被蛋白質から構成されている。ところが、当研究室保存のBMV ATCC66系統では、2種の分子量の外被蛋白質が検出された。この現象を分子生物学的手法を用いて詳細に調べた。

1. BMV ATCC66系統のゲノムRNA1、RNA2およびRNA3からそれぞれ全長cDNAを作製し、転写ベクター中のT7プロモーターの下流に挿入した。これらの転写ベクターから転写されたRNAは、BMVの全身感染宿主であるオオムギおよび局部病斑宿主である*Chenopodium hybridum*に感染性を示した。また、オオムギプロトプラストに接種すると、ATCC66系統と全く同様に、2種の分子量の外被蛋白質が検出された。
2. 本実験で得られたBMV ATCC66系統のゲノムRNAに対する全長cDNAの全塩基配列を調べ、Russian系統の配列と比較した結果、3種のゲノムRNA全てにおいて97%以上の相同性がみられた。3'端非翻訳領域のtRNA様構造中にみられた塩基置換は、すべて2次構造に影響を与えないような置換であった。多くのRNAウイルス間で保存されている領域におけるアミノ酸置換のほとんどは性質の類似したアミノ酸間の置換であった。
3. BMV Russian系統では粒子を構成する外被蛋白質は1種であることが報告されている。ATCC66系統の全塩基配列を、Russian系統の配列と比較した結果、外被蛋白質のmRNAであるRNA4の5'端非翻訳領域の塩基配列は、ATCC66系統では[GUAUUUA

AUG]、Russian系統では[GUAUUAUAAUG]であり、ATCC66系統では(AA)配列が欠失していた。

4. RNA4配列の5'端非翻訳領域に(AA)配列をもつRNA3とまたないRNA3をそれぞれRNA1およびRNA2と混合し、オオムギのプロトプラストあるいは植物体に接種すると、いずれの実験においても、前者の場合1種の、後者の場合2種の分子量の外被蛋白質が検出された。一方、(AA)配列の復帰によって、新たな分子量のRNA4の転写は認められなかったことから、ATCC66系統で2種の分子量の外被蛋白質が検出されたのは、(AA)配列の欠失が原因であり、その生成機構はマイナス鎖RNA3からのRNA4の転写レベルではなく、RNA4からの翻訳レベルにあることが強く示唆された。

5. 外被蛋白質遺伝子のC端付近に翻訳停止コドンを導入した RNA3をRNA1およびRNA2と混合し、オオムギプロトプラストに接種すると、もとのRNA3を接種した場合よりも分子量が小さいながらも2種の分子量の外被蛋白質が検出された。また、RNA4の塩基配列から、1番目の翻訳開始コドン(AUG)の21塩基下流に同じ読み枠で2番目の翻訳開始コドンが認められた。この結果、ATCC66系統ではこれら2ヶ所のAUGから翻訳が開始されていることが示唆された。

6. In vitroでRNA4を合成する系を確立し、得られたRNA4をin vitro蛋白質合成系に加えると、5'端非翻訳領域に(AA)配列をもつRNA4(F4W)の場合、ほとんど1種類、その配列をもたないRNA4(F4)の場合は、完全に2種の分子量の外被蛋白質が検出された。

7. F4WとF4の両方について1番目のAUGからの蛋白質合成がすぐに停止するようにすると、いずれの場合も、分子量の小さい蛋白質のみが検出された。この結果、2番目のAUGも翻訳開始コドンとして機能し得ること、さらにF4で検出された2種の分子量の蛋白質は、1番目のAUGと2番目のAUGから翻訳されたものであることが強く示唆された。

8. F4Wの1番目のAUGの周辺に種々の変異が導入されたRNA4をin vitro蛋白質合成系に加えた結果、ATCC66系統では、1番目のAUGの3塩基上流(-3位)の塩基がUになっていることが、1番目のAUGからの翻訳活性を低下させ、逆に2番目の開始コドンからの翻訳を活性化させる主要因であることが明らかとなった。

9. BMV RNA4では、5'端非翻訳領域から2塩基欠失した変異体全てにおいて翻訳活性の低下が認められた。また、BMV ATCC66系統のRNA4では、1番目のAUGのAを含む4塩基下流(+4位)の塩基がUの場合、翻訳活性が低下した。

10. 以上の結果、BMV ATCC66系統において2種の分子量の外被蛋白質が検出された原因を以下のように結論した。RNA3内のRNA4配列中の5'端非翻訳領域から(AA)配列が欠失することによってこの領域が短くなり、同時に1番目のAUGの-3位の塩基がUになった。その結果、この部位での真核生物型リボゾームの40Sサブユニットの停止効率が悪くなり、一部が2番目のAUGにスライドし、そこから外被蛋白質が合成された。その際、1番目のAUGの+4位の塩基がUであったために活性の低下を補えず、ウイルス粒子から2種の分子量の外被蛋白質が検出されるという表現型となって現われた。

## 引用文献

- 1) Ahlquist, P., Dasgupta, R., Shih, D. S., Zimmern, D. & Kaesberg, P. (1979). Two-step binding of eukaryotic ribosomes to brome mosaic virus RNA3. *Nature* 281: 277-282.
- 2) Ahlquist, P., Dasgupta, R. & Kaesberg, P. (1981). Near identity of 3' RNA secondary structure in bromoviruses and cucumber mosaic virus. *Cell* 23: 183-189.
- 3) Ahlquist, P., Luckow, V. & Kaesberg, P. (1981). Complete nucleotide sequence of brome mosaic virus RNA3. *J. Mol. Biol.* 153: 23-38.
- 4) Ahlquist, P., Dasgupta, R. & Kaesberg, P. (1984). Nucleotide sequence of the brome mosaic virus genome and its implications for viral replication. *J. Mol. Biol.* 172: 369-383.
- 5) Ahlquist, P., Bujarski, J. J. & Hall, T. C. (1984). Localization of the replicase recognition site within brome mosaic virus RNA by hybrid-arrested RNA synthesis. *Plant Mol. Biol.* 3: 37-44.
- 6) Ahlquist, P. & Janda, M. (1984). cDNA cloning and in vitro transcription of the complete brome mosaic virus genome. *Mol. Cell. Biol.* 4: 2876-2882.
- 7) Ahlquist, P., French, R., Janda, M. & Loesch-Fries, S. (1984). Multicomponent RNA plant virus infection derived from cloned viral cDNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 7066-7070.
- 8) Ahlquist, P., Strauss, E. G., Rice, C. M., Strauss, J. H., Haseloff, J. & Zimmern D. (1985). Sindbis virus proteins nsP1 and nsP2 contain homology to nonstructural proteins from several RNA plant viruses. *J. Virol.* 53: 536-542.
- 9) Allison, R. F., Janda, M. & Ahlquist, P. (1988). Infectious in vitro transcripts from cowpea chlorotic mottle virus cDNA clones and exchange of individual RNA components with brome mosaic virus. *J. Virol.* 62: 3581-3588.



- 10) Allison, R. F., Janda, M. & Ahlquist, P. (1989). Sequence of cowpea chlorotic mottle virus RNAs 2 and 3 and evidence of a recombination event during bromovirus evolution. *Virology* 172: 321-330.
- 11) Allison, R. F. & Ahlquist, P. (1989). Construction and testing of bromo mosaic and cowpea chlorotic mottle virus hybrids. In *Molecular Biology of Plant-Pathogen Interactions* (Staskawicz, B., Ahlquist, P. & Yoder, O., eds.), pp.105-116., Alan R. Liss, Inc, New York.
- 12) Allison, R. F., Thompson, C. & Ahlquist, P. (1990). Regeneration of a functional RNA virus genome by recombination between deletion mutants and requirement for cowpea chlorotic mottle virus 3a and coat genes for systemic infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 1820-1824.
- 13) Angenent, G. C., Posthumus, E. & Bol, J. F. (1989). Biological activity of transcripts synthesized in vitro from full-length and mutated DNA copies of tobacco rattle virus RNA2. *Virology* 173: 68-76.
- 14) Ballas, N., Zakai, N. & Loyter, A. (1987). Transient expression of the plasmids pCaMVCAI in plant protoplasts following transformation with polyethylene glycol. *Exp. Cell Res.* 170: 229-234.
- 15) Baulcombe, D. (1989). Strategies for virus resistance in plants. *Trends Genet.* 5: 56-60.
- 16) Beachy, R. N., Loesch-Fries, S. & Tumer, N. E. (1990). Coat protein-mediated resistance against virus infection. *Annu. Rev. Phytopathol.* 28: 451-474.
- 17) Beck, D. L., Forster, R. L. S., Bevan, M. W., Boxen, K. A. & Lowe, S. C. (1990). Infectious transcripts and nucleotide sequence of cloned cDNA of the potexvirus white clover mosaic virus. *Virology* 177: 152-158.
- 18) Beier, H., Barciszewska, M., Krupp, G., Mitnacht, R. & Gross, H. J. (1984). UAG readthrough during TMV RNA translation: isolation and

- sequence of two tRNAs<sup>Trp</sup> with suppressor activity from tobacco plants. EMBO J. 3: 351-356.
- 19) Bujarski, J. J., Dreher, T. W. & Hall T. C. (1985). Deletion in the 3'-terminal tRNA like structure of brome mosaic virus RNA differentially affect aminoacylation and replication in vitro. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 5636-5640.
  - 20) Bujarski, J. J. & Kaesberg, P. (1986). Genetic recombination between RNA components of a multipartite plant virus. Nature 321: 528-531.
  - 21) Bujarski, J. J., Ahlquist, P., Hall, T. C., Dreher, T. W. & Kaesberg, P. (1986). Modulation of replication, aminoacylation and adenylation in vitro and infectivity in vivo of BMV RNAs containing deletions within the multifunctional 3' end. EMBO J. 5: 1769-1774.
  - 22) Carrington, J. C., Heaton, L. A., Zuidema, D., Hillman, B. I. & Morris, T. J. (1989). The genome structure of turnip crinkle virus. Virology 170: 219-226.
  - 23) Dasgupta, R. & Kaesberg, P. (1982). Complete nucleotide sequence of the coat protein messenger RNAs of brome mosaic virus and cowpea chlorotic mottle virus. Nucl. Acids Res. 10: 703-713.
  - 24) Davies, C. & Symons, R. H. (1988). Further implications for the evolutionary relationships between tripartite plant viruses based on cucumber mosaic virus RNA3. Virology 165: 216-224.
  - 25) Dawson, W. O., Beck, D. L., Knorr, D. A. & Grantham, G. L. (1986). cDNA cloning of the complete genome of tobacco mosaic virus and production of infectious transcripts. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 1832-1836.
  - 26) Dawson, W. O., Bubrick, P. & Grantham, G. L. (1988). Modifications of the tobacco mosaic virus coat protein gene affecting replication, movement, and symptomatology. Phytopathology 78: 783-789.

- 27) DeBorde, D. C., Maeve, C. W., Herlocher, M. L. & Maassab, H. F. (1986). Resolution of a common RNA sequencing ambiguity by terminal deoxynucleotidyl transferase. *Anal. Biochem.* 157: 275-282.
- 28) Deom, C. M., Oliver, M. J. & Beachy, R. N. (1987). The 30-kilodalton gene product of tobacco mosaic virus potentiates virus movement. *Science* 237: 389-394.
- 29) Domier, L. L., Franklin, K. M., Hunt, A. G., Rhoads, R. E. & Shaw, J. G. (1989). Infectious in vitro transcripts from cloned cDNA of a potyvirus, tobacco vein mottling virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 3509-3513.
- 30) Domingo, E., Martinez-Salas, E., Sobrino, F., de la Torre, J. C., Portela, A., Ortin, J., Lopez-Galindez, C., Perez-Brena, P., Villanueva, N., Najera, R., VandePol, S., Steinhauer, D., DePolo, N. & Holland, J. (1985). The quasispecies (extremely heterogeneous) nature of viral RNA genome populations: biological relevance - a view. *Gene* 40: 1-8.
- 31) Donis-Keller, H. (1980). Phy M: an RNase activity specific for U and A residues useful in RNA sequence analysis. *Nucl. Acids Res.* 8: 3133-3142.
- 32) Dreher, T. W., Bujarski, J. J. & Hall, T. C. (1984). Mutant viral RNAs synthesized in vitro show altered aminoacylation and replicase template activities. *Nature* 311: 171-175.
- 33) Dreher, T. W. & Hall, T. C. (1988). Mutational analysis of the sequence and structural requirements in brome mosaic virus RNA for minus strand promoter activity. *J. Mol. Biol.* 201: 31-40.
- 34) Dreher, T. W., Rao, A. L. N. & Hall, T. C. (1989). Replication in vivo of mutant brome mosaic virus RNAs defective in aminoacylation. *J. Mol. Biol.* 206: 425-438.
- 35) Fraenkel-Conrat, H. (1956). The role of the nucleic acid in the reconstitution of active tobacco mosaic virus. *J. Am. Chem. Soc.* 78: 882-883.

- 36) Franssen, H., Goldbach, R., Broekhuysen, M., Moerman, M. & van Kammen, A. (1982). Expression of middle-component RNA of cowpea mosaic virus: in vitro generation of a precursor to both capsid proteins by a bottom-component RNA-encoded protease from infected cells. J. Virol. 41: 8-17.
- 37) French, R., Janda, M. & Ahlquist, P. (1986). Bacterial gene inserted in an engineered RNA virus: efficient expression in monocotyledonous plant cells. Science 231: 1294-1297.
- 38) French, R. & Ahlquist, P. (1987). Intercistronic as well as terminal sequences are required for efficient amplification of brome mosaic virus RNA3. J. Virol. 61: 1457-1465.
- 39) French, R. & Ahlquist, P. (1988). Characterization and engineering of sequences controlling in vivo synthesis of brome mosaic virus subgenomic RNA. J. Virol. 62: 2411-2420.
- 40) Goelet, P., Lomonossoff, G. P., Butler, P. J. G., Akam, M. E., Gait, M. J. & Karn, J. (1982). Nucleotide sequence of tobacco mosaic virus RNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79: 5818-5822.
- 41) Goldbach, R. (1987). Genome similarities between plant and animal RNA viruses. Microbiol. Sci. 4: 197-205.
- 42) Gopinathan, K. P., Weymouth, L. A., Kunkel, T. A. & Loeb, L. A. (1979). Mutagenesis in vitro by DNA polymerase from an RNA tumour virus. Nature 278: 857-859.
- 43) Gould, A. R. & Symons R. H. (1982). Cucumber mosaic virus RNA3 - determination of the nucleotide sequence provides the amino acid sequences of protein 3A and viral coat protein. Eur. J. Biochem. 126: 217-226.
- 44) Gubler, U. & Hoffman, B. J. (1983). A simple and very efficient method for generating cDNA libraries. Gene 25: 263-269.
- 45) Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. J. Mol. Biol. 166: 557-580.

- 46) Haseloff, J., Goelet, P., Zimmern, D., Ahlquist, P., Dasgupta, R. & Kaesberg, P. (1984). Striking similarities in amino acid sequence among nonstructural proteins encoded by RNA viruses that have dissimilar genomic organization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 4358-4362.
- 47) Hayes R. J. and Buck, K. W. (1990). Infectious cucumber mosaic virus RNA transcribed in vitro from clones obtained from cDNA amplified using the polymerase chain reaction. *J. Gen. Virol.* 71: 2503-2508.
- 48) Hayes R. J. and Buck, K. W. (1990). Complete replication of a eukaryotic virus RNA in vitro by a purified RNA-dependent RNA polymerase. *Cell* 63: 363-368.
- 49) Heaton, L. A., Carrington, J. C. & Morris, T. J. (1989). Turnip crinkle virus infection from RNA synthesized in vitro. *Virology* 170: 214-218.
- 50) Hodgman, T. C. (1988). A new superfamily of replicative proteins. *Nature* 333: 22-23.
- 51) Hodgson, R. A. J., Beachy, R. N. & Pakrasi, H. B. (1989). Selective inhibition of photosystem II in spinach by tobacco mosaic virus: an effect of the viral coat protein. *FEBS Lett.* 245: 267-270.
- 52) Horikoshi, M., Nakayama, M., Yamaoka, N., Furusawa, I. & Shishiyama, J. (1987). Brome mosaic virus coat protein inhibits viral RNA synthesis in vitro. *Virology* 158: 15-19.
- 53) Horikoshi, M., Mise, K., Furusawa, I. & Shishiyama, J. (1988). Further studies on inhibitory effect of brome mosaic virus coat protein on the viral RNA synthesis in vitro. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 54: 533-535.
- 54) Horikoshi, M., Mise, K., Furusawa, I. & Shishiyama, J. (1988). Immunological analysis of brome mosaic virus replicase. *J. Gen. Virol.* 69: 3081-3087.

- 55) Houwing, C. J. & Jaspars, E. M. J. (1986). Coat protein blocks the in vitro transcription of the virion RNAs of alfalfa mosaic virus. FEBS Lett. 209: 284-288.
- 56) Houwing, C. J. & Jaspars, E. M. J. (1987). In vitro evidence that the coat protein is the programming factor in alfalfa mosaic virus-induced RNA synthesis. FEBS Lett. 221: 337-342.
- 57) Janda, M., French, R. & Ahlquist, P. (1987). High efficiency T7 polymerase synthesis of infectious RNA from cloned brome mosaic virus cDNA and effects of 5' extensions on transcript infectivity. Virology 158: 259-262.
- 58) Joshi, R. L., Joshi, S., Chapeville, F. & Haenni, A. L. (1983). tRNA-like structures of plant viral RNAs: conformational requirements for adenylation and aminoacylation. EMBO J. 2: 1123-1127.
- 59) Kamer, G. & Argos, P. (1984). Primary structural comparison of RNA-dependent polymerases from plant, animal and bacterial viruses. Nucl. Acids Res. 12: 7269-7282.
- 60) Kaplan, G., Lubinski, J., Dasgupta, A. & Racaniello, V. R. (1985). In vitro synthesis of infectious poliovirus RNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 8424-8428.
- 61) Kataoka, J., Masuta, C. & Takanami, Y. (1990). Complete nucleotide sequence of RNA2 of cucumber mosaic virus Y strain. Ann. Phytopath. Soc. Japan 56: 495-500.
- 62) Kelley, D., Coleclough, C. & Perry, R. P. (1982). Functional significance and evolutionary development of the 5'-terminal regions of immunoglobulin variable-region genes. Cell 29: 681-689.
- 63) Kiberstis, P. A., Loesch-Fries, S. & Hall, T. C. (1981). Viral coat protein synthesis in barley protoplasts inoculated with native and fractionated brome mosaic virus RNA. Virology 112: 804-808.
- 64) Kozak, M. (1981). Possible role of flanking nucleotides in

- recognition of the AUG initiator codon by eukaryotic ribosomes. Nucl. Acids Res. 9: 5233-5252.
- 65) Kozak, M. (1983). Comparison of initiation of protein synthesis in prokaryotes, eukaryotes, and organelles. Microbiol. Rev. 47: 1-45.
- 66) Kozak, M. (1986). Bifunctional messenger RNAs in eukaryotes. Cell 47: 481-483.
- 67) Kozak, M. (1986). Point mutations define a sequence flanking the AUG initiator codon that modulates translation by eukaryotic ribosomes. Cell 44: 283-292.
- 68) Kozak, M. (1986). Influence of mRNA secondary structure on initiation by eukaryotic ribosomes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 2850-2854.
- 69) Kunkel, T. A., Roberts, J. D. & Zakour, R. A. (1987). Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection. Methods Enzymol. 154: 367-382.
- 70) Kuwata, S., Masuta, C. & Takanami, Y. (1988). Construction of novel transcription vectors for production of biologically active transcripts from viral cDNAs. Ann. Phytopath. Soc. Japan 54: 510-515.
- 71) Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227: 680-685.
- 72) Lane, L. C. & Kaesberg, P. (1971). Multiple genetic components in bromegrass mosaic virus. Nature New Biol. 232: 40-43.
- 73) Lane, L. C. (1981). Bromoviruses. In Handbook of plant virus infections and comparative diagnosis (Kurstak, E., ed.), pp. 333-376., Elsevier/North-Holland Biomedical Press., Amsterdam.
- 74) Maekawa, K. & Furusawa, I. (1984). Purification of RNA-dependent RNA polymerase from bromegrass mosaic virus-infected barley leaves. Ann. Phytopath. Soc. Japan 50: 491-499.

- 75) Maniatis, T., Fritsch, E. F. & Sambrook, J. (1982). "Molecular cloning: a laboratory manual.", Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- 76) Marsh, L. E., Dreher, T. W. & Hall, T. C. (1988). Mutational analysis of the core and modulator sequences of the BMV RNA3 subgenomic promoter. Nucl. Acids Res. 16: 981-995.
- 77) Marsh, L. E., Pogue, G. P. & Hall, T. C. (1989). Similarities among plant virus (+) and (-) RNA termini imply a common ancestry with promoters of eukaryotic tRNAs. Virology 172: 415-427.
- 78) Meshi, T., Ishikawa, M., Takamatsu, N., Ohno, T. & Okada, Y. (1983). The 5'-terminal sequences of TMV RNA question on the polymorphism found in vulgare strain. FEBS Lett. 162: 282-285.
- 79) Meshi, T., Ishikawa, M., Motoyoshi, F., Semba, K. & Okada, Y. (1986). In vitro transcription of infectious RNAs from full-length cDNAs of tobacco mosaic virus. Proc. Natl Acad. Sci. USA 83: 5043-5047.
- 80) Meshi, T., Watanabe, Y., Saito, T., Sugimoto, A., Maeda, T. & Okada, Y. (1987). Function of the 30Kd protein of tobacco mosaic virus: involvement in cell-to-cell movement and dispensability for replication. EMBO J. 6: 2557-2563.
- 81) Melton, D. A., Krieg, P. A., Rebagliati, M. R., Maniatis, T., Zinn, K. & Green, M. R. (1984). Efficient in vitro synthesis of biologically active RNA and RNA hybridization probes from plasmids containing a bacteriophage SP6 promoter. Nucl. Acids Res. 12: 7035-7056.
- 82) Miller, W. A. & Hall T. C. (1983). Use of micrococcal nuclease in the purification of highly template dependent RNA-dependent RNA polymerase from brome mosaic virus-infected barley. Virology 125: 236-241.
- 83) Miller, W. A., Dreher, T. W. & Hall, T. C. (1985). Synthesis of brome mosaic virus subgenomic RNA in vitro by internal initiation



- on (-)-sense genomic RNA. Nature 313: 68-70.
- 84) Miller, W. A., Bujarski, J. J., Dreher, T. W. & Hall, T. C. (1986). Minus-strand initiation by brome mosaic virus replicase within the 3' tRNA-like structure of native and modified RNA template. J. Mol. Biol. 187: 537-546.
- 85) 三瀬和之 & 古澤 巖 (1988). ブロムモザイクウイルス-In vitroにおける RNA合成とその制御-. 細胞工学 7: 240-248.
- 86) Miyata, T., Miyazawa, S. & Yasunaga, T. (1979). Two types of amino acid substitutions in protein evolution. J. Mol. Evol. 12: 219-236.
- 87) Mohlehr, E., Pinck, L. & Hirth, L. (1974). Replication of alfalfa mosaic virus RNAs. Virology 58: 9-15.
- 88) Mori, M., Mise, K., Kobayashi, K., Okuno, T. & Furusawa, I. (1991). Infectivity of plasmids containing brome mosaic virus cDNA linked to the cauliflower mosaic virus 35S RNA promoter. J. Gen. Virol. 72: (in press).
- 89) Okuno, T., Furusawa, I. & Hiruki, C. (1977). Infection of barley protoplasts with brome mosaic virus. Phytopathology 67: 610-615.
- 90) Okuno, T. & Furusawa, I. (1977). A simple method for the isolation of intact mesophyll protoplasts from cereal plants. Plant & Cell Physiol. 18: 1357-1362.
- 91) Okuno, T. & Furusawa, I. (1978). Factors influencing the infection of barley mesophyll protoplasts with brome mosaic virus RNA. J. Gen. Virol. 41: 63-75.
- 92) Peattie, D. A. (1979). Direct chemical method for sequencing RNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76: 1760-1764.
- 93) Petty, I. T. D., Hunter, B. G., Wei, N. & Jackson, A. O. (1989). Infectious barley stripe mosaic virus RNA transcribed in vitro from full-length genomic cDNA clones. Virology 171: 342-349.

- 94) Petty, I. T. D. & Jackson, A. O. (1990). Two forms of the major barley stripe mosaic virus nonstructural protein are synthesized in vivo from alternative initiation codons. *Virology* 177: 829-832.
- 95) Piatak, M., Ghosh, P. K., Reddy, V. B., Lebowitz, P. & Weissman, S. M. (1979). Complex structures and new surprises in SV40 mRNA. In ICN-UCLA symposia on molecular and cellular biology. Vol 15. pp. 199-215. Academic Press Inc., New York.
- 96) Poch, O., Sauvaget, I., Delarue, M. & Tordo, N. (1989). Identification of four conserved motifs among the RNA-dependent polymerase encoding elements. *EMBO J.* 8: 3867-3874.
- 97) Pogue, G. P., Marsh, L. E. & Hall, T. C. (1990). Point mutation in the ICR2 motif of brome mosaic virus RNAs debilitate (+)-strand replication. *Virology* 178: 152-160.
- 98) Quadt, R., Verbeek, H. J. M. & Jaspars, E. M. J. (1988). Involvement of a nonstructural protein in the RNA synthesis of brome mosaic virus. *Virology* 165: 256-261.
- 99) Quillet, L., Guilley, H., Jonard, G. & Richards, K. (1989). In vitro synthesis of biologically active beet necrotic yellow vein virus RNA. *Virology* 172: 293-301.
- 100) Racaniello, V. R. & Baltimore, D. (1981). Cloned poliovirus complementary DNA is infectious in mammalian cells. *Science* 214: 916-919.
- 101) Rao, A. L. N., Sullivan, B. P. & Hall, T. C. (1990). Use of Chenopodium hybridum facilitates isolation of brome mosaic virus RNA recombinants. *J. Gen Virol.* 71: 1403-1407.
- 102) Register, III, J. C., Powell, P. A., Nelson, R. S. & Beachy, R. N. (1989). Genetically engineered cross protection against TMV interferes with initial infection and long distance spread of the virus. In *Molecular Biology of Plant-Pathogen Interactions* (Staskawicz, B., Ahlquist, P. & Yoder, O., eds.), pp. 269-281., Alan R. Liss, Inc, New York.

- 103) Reinero, A. & Beachy, R. N. (1986). Association of TMV coat protein with chloroplast membranes in virus-infected leaves. *Plant Mol. Biol.* 6: 291-301.
- 104) Rietveld, K., Pleij, C. W. A. & Bosch, L. (1983). Three-dimensional models of the tRNA-like 3' termini of some plant viral RNAs. *EMBO J.* 2: 1079-1085.
- 105) Rizzo, T. M. & Palukaitis, P. (1990). Construction of full-length cDNA clones of cucumber mosaic virus RNAs 1, 2 and 3: Generation of infectious RNA transcripts. *Mol. Gen. Genet.* 222: 249-256.
- 106) Sacher, R. & Ahlquist, P. (1989). Effects of deletions in the N-terminal basic arm of brome mosaic virus coat protein on RNA packaging and systemic infection. *J. Virol.* 63: 4545-4552.
- 107) Saito, T., Meshi, T., Takamatsu, N. & Okada, Y. (1987). Coat protein gene sequence of tobacco mosaic virus encodes a host response determinant. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 6074-6077.
- 108) Saito, T., Yamanaka, K., Watanabe, Y., Takamatsu, N., Meshi, T. & Okada, Y. (1989). Mutational analysis of the coat protein gene of tobacco mosaic virus in relation to hypersensitive response in tobacco plants with the N' gene. *Virology* 173: 11-20.
- 109) Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 5463-5467.
- 110) Sgro, J., Jacrot, B. & Chroboczek, J. (1986). Identification of regions of brome mosaic virus coat protein chemically cross-linked in situ to viral RNA. *Eur. J. Biochem.* 154: 69-76.
- 111) Shih, D. S. & Kaesberg, P. (1973). Translation of brome mosaic viral ribonucleic acid in a cell-free system derived from wheat embryo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70: 1799-1803.
- 112) Shine, J. & Dalgarno, L. (1974). The 3'-terminal sequence of E. coli 16S rRNA: complementarity to nonsense triplets and ribosome

- binding sites. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71: 1342-1346.
- 113) 獅山慈孝 (1989). 植物病理学実験マニュアル. 養賢堂, 東京.
- 114) Silva, J. L. & Weber, G. (1988). Pressure-induced dissociation of brome mosaic virus. J. Mol. Biol. 199: 149-159.
- 115) Stanley, W. M. (1935). Isolation of a crystalline protein possessing the properties of tobacco-mosaic virus. Science 81: 644-645.
- 116) Stippel, A. E. (1973). Purification and characterization of adenosine triphosphate: ribonucleic acid adenylyltransferase from Escherichia coli. Eur. J. Biochem. 37: 31-40.
- 117) Symons, R. H. (1979). Extensive sequence homology at the 3'-termini of the four RNAs of cucumber mosaic virus. Nucl. Acids Res. 7: 825-837.
- 118) Takamatsu, N., Ishikawa, M., Meshi, T. & Okada, Y. (1987). Expression of bacterial chloramphenicol acetyltransferase gene in tobacco plants mediated by TMV-RNA. EMBO J. 6: 307-311.
- 119) Taniguchi, T., Palmieri, M. & Weissmann, C. (1978). Q $\beta$  DNA-containing hybrid plasmids giving rise to Q $\beta$  phage formation in the bacterial host. Nature 274: 223-228.
- 120) Temin, H. M. & Mizutani, S. (1970). RNA-dependent DNA polymerase in virions of rous sarcoma virus. Nature 226: 1211-1213.
- 121) van Vloten-Doting, L., Bol, J. & Cornelissen, B. (1985). Plant virus based vectors for gene transfer will be of limited use because of the high error frequency during viral RNA synthesis. Plant Mol. Biol. 4: 323-326.
- 122) Vieira, J. & Messing, J. (1987). Production of single-stranded plasmid DNA. Methods Enzymol. 153: 3-11.
- 123) Vos, P., Jaegle, M., Wellink, J., Verver, J., Eggen, R., van Kammen, A. & Goldbach, R. (1988). Infectious RNA transcripts

derived from full-length DNA copies of the genomic RNAs of cowpea mosaic virus. Virology 165: 33-41.

- 124) Weiland, J. J. & Dreher, T. W. (1989). Infectious TYMV RNA from cloned cDNA: effects in vitro and in vivo of point substitutions in the initiation codons of two extensively overlapping ORFs. Nucl. Acids Res. 17: 4675-4687.
- 125) Wellink, J. & van Kammen, A. (1989). Cell-to-cell transport of cowpea mosaic virus requires both the 58K/48K proteins and the capsid proteins. J. Gen. Virol. 70: 2279-2286.
- 126) Wilson, E. T., Larson, D. Young, L. S. & Sprague, K. U. (1985). A large region controls tRNA gene transcription. J. Mol. Biol. 183: 153-163.
- 127) Yanisch-Perron, C., Vieira, J. & Messing, J. (1985). Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. Gene 33: 103-119.
- 128) Young, M. J., Kelly, L., Larkin, P. J., Waterhouse, P. M. & Gerlach, W. L. (1991). Infectious in vitro transcripts from a cloned cDNA of barley yellow dwarf virus. Virology 180: 372-379.
- 129) Zaitlin, M. & Hull, R. (1987). Plant virus-host interactions. Ann. Rev. Plant Physiol. 38: 291-315.